



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

**INIBIÇÃO DE LINHAGENS DO COMPLEXO *Fusarium graminearum* POR
COMPOSTOS NATURAIS E SINTÉTICOS**

RENATA HEIDTMANN BEMVENUTI

PROF^a. DR^a. ELIANA BADIALE FURLONG
Orientadora

RIO GRANDE, RS
2014

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

**INIBIÇÃO DE LINHAGENS DO COMPLEXO *Fusarium graminearum* POR
COMPOSTOS NATURAIS E SINTÉTICOS**

RENATA HEIDTMANN BEMVENUTI

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

PROF^a. DR^a. ELIANA BADIALE FURLONG
Orientadora

RIO GRANDE, RS

2014

Ficha Catalográfica

--

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tese defendida por Renata Heidtmann Bemvenuti e aprovada em 6 de junho de 2014 pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:

Prof^ª. Dr^ª. Eliana Badiale Furlong - FURG

Prof. Dr. Benedito Corrêa - USP

Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Arnhold Pagnussatt - FURG

Prof^ª. Dr^ª. Janaína Fernanades de Medeiros Burkert - FURG

Prof^ª. Dr^ª. Leonor Almeida de Souza Soares - FURG

Prof^ª. Dr^ª. Susana Juliano Kalil - FURG

Ao meu amigo, companheiro e marido **Leandro**.

À minha mãe **Joice**.

Aos meus **avós** Iracema (*in memorium*) e Jorge.

AGRADECIMENTOS

À professora **Eliana**, por todos esses anos de orientação....foram quase seis...por me aceitar e pelos ensinamentos, que foram além dos técnicos. Obrigada por estar ao meu lado todos esses anos e espero que, de alguma forma, continuemos juntas...

À amiga **Luciana**, uma pessoa maravilhosa que tive a sorte de conhecer e tenho certeza que seremos eternas amigas...À **Michele**, uma amiga muito especial, que esteve ao meu lado em todos os momentos e que posso contar sempre...À **Lidi**, minha amiga sincera e companheira. Adoro vocês!

Às amigas e amigos **Cristiano, Adri, Muri, Elisa, Tânia, Gini Vivian, Ane, Helen e Matias** pelas conversas divertidas e pela companhia agradável.

Às minhas ajudantes: **Katherine**, à divertida **Letícia** e à **Cláudia**, que chegou por último com toda a vontade do mundo em ajudar e fazer o seu melhor...

Aos demais integrantes do laboratório por, de alguma forma, ajudarem no meu amadurecimento pessoal e profissional.

Ao Professor **Benedito Corrêa**, por abrir as portas de seu laboratório para que fizéssemos as análises de PCR; e à querida **Sabina**, que com sua enorme paciência e sabedoria me ajudou muito com as análises PCR.

À **Jesus e Jaque**, por sempre me ajudarem nos momentos em que precisei.

À professora **Susana**, uma pessoa que admiro pessoal e profissionalmente, obrigada pelas conversas agradáveis.

À **Islanda** e sua equipe, por estarem sempre dispostas para o que fosse preciso.

À **Shana, Roberta, Jú, Rafa, Marília e Susan**, minhas colegas da pós....sempre vou lembrar de vocês com carinho.

A todos professores que tanto me ensinaram desde a graduação até a pós-graduação, em especial as professoras **Leonor e Fernanda** pelas dicas no exame de qualificação.

Gostaria de agradecer a **banca** pela disponibilidade de avaliar este trabalho.

À **Base Fértil Ribeirão Agrícola**, pelo fornecimento das sementes de Nim.

Ao Professor **Emerson Del Ponte** (UFRGS), por ceder linhagens do Complexo *F. graminearum*.

À **FURG** e a **CAPES** por proporcionarem o desenvolvimento de meus estudos.

"Felicidade é ter o que fazer, ter algo que amar e algo que esperar".

Aristóteles

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
CAPÍTULO I	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
1 INTRODUÇÃO.....	4
2 OBJETIVOS.....	6
2.1 Objetivo geral	6
2.2 Objetivos específicos.....	6
CAPÍTULO II.....	7
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	8
3.1 Fungos toxigênicos e micotoxinas em alimentos	8
3.1.1 Fungos toxigênicos	8
3.1.2 Micotoxinas	10
3.1.2.1 Tricotecenos.....	12
3.1.2.2 Zearalenona	13
3.1.2.3 Métodos de determinação de toxinas de <i>Fusarium</i>	14
3.1.2.4 Legislação para micotoxinas de <i>Fusarium</i>	15
3.2 Antifúngicos sintéticos	16
3.2.1 Riscos toxicológicos dos agrotóxicos.....	17
3.2.2 Fungicidas.....	19
3.3 Antifúngicos naturais.....	20
3.3.1 Compostos fenólicos	21
3.3.2 Terpenos das sementes de nim	23
3.4 Antioxidantes.....	26
3.4.1 Método do radical DPPH.....	28
3.4.2 Método do radical ABTS.....	29
3.4.3 Método de redução do ferro (FRAP)	30
3.4.4 Método da inibição da oxidação enzimática.....	31
3.5 Cluster gênico da biossíntese de tricotecenos	31
3.6 Mecanismo dos compostos inibidores do crescimento fúngico	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

CAPÍTULO III	48
ARTIGO 1	49
EXTRAÇÃO DE γ -ORIZANOL DE FARELO DE ARROZ.....	50
RESUMO	50
1 INTRODUÇÃO.....	50
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
2.1 Padrão, reagentes e amostras.....	51
2.2 Testes preliminares.....	51
2.3 Planejamento experimental para estudo das condições de extração do γ -orizanol ..	52
2.4 Extração de γ -orizanol usada no CCRD	53
2.5 Quantificação de γ -orizanol.....	53
2.6 Análise dos dados	53
2.7 Parâmetros de validação	53
2.8 Estabilidade do γ -orizanol em hexano e isopropanol	54
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
3.1 Testes preliminares	54
3.2 Delineamento experimental para estudar as condições de extração do γ -orizanol...	55
3.3 Parâmetros de validação	59
3.4 Estabilidade do γ -orizanol em hexano e isopropanol	60
4 CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
ARTIGO 2	64
CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FITOQUÍMICOS DE FARELO DE ARROZ E SEMENTES DE NIM	65
RESUMO	65
1 INTRODUÇÃO.....	65
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	67
2.1 Caracterização físico-química das matérias-primas (farelo de arroz e sementes de nim).....	67
2.2 Extração de γ -orizanol do farelo de arroz.....	67
2.3 Caracterização do γ -orizanol	68
2.3.1 Perfil de ácidos graxos.....	68
2.3.2 Perfil dos componentes majoritários do γ -orizanol	68
2.4 Extração dos compostos fenólicos do farelo de arroz e de sementes de nim	69

2.5 Caracterização dos compostos fenólicos do farelo de arroz e de sementes de nim..	69
2.6 Atividade antioxidante dos compostos extraídos de fontes naturais	70
2.6.1 Captura do radical livre DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila).....	70
2.6.2 Captura do radical ABTS●+ (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)).....	71
2.6.3 Método de redução do ferro (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> - FRAP)	71
2.6.4 Inibição da oxidação enzimática.....	72
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
3.1 Caracterização físico-química das matérias-primas	72
3.2 Caracterização do γ -orizanol	74
3.2.1 Perfil de ácidos graxos.....	74
3.2.2 Perfil dos componentes majoritários do γ -orizanol	74
3.3 Caracterização dos compostos fenólicos	75
3.4 Atividade antioxidante dos compostos extraídos de fontes naturais	77
4 CONCLUSÃO.....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
ARTIGO 3	88
ATIVIDADE DE γ -ORIZANOL NO DESENVOLVIMENTO DE <i>Fusarium graminearum</i> CQ244 E MICOTOXINAS	89
RESUMO	89
1 INTRODUÇÃO.....	89
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	90
2.1 Matéria-prima e padrões analíticos	90
2.2 Preparo dos antifúngicos sintéticos e natural	91
2.3 Testes prévios à extração de micotoxinas.....	91
2.4 Avaliação da atividade antifúngica e antimicotoxinas	93
2.4.1 Isolamento e crescimento do fungo <i>F. graminearum</i> CQ244	93
2.4.2 Inoculação e incubação.....	93
2.4.3 Medida do desenvolvimento fúngico	94
2.4.4 Determinação de micotoxinas	95
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
3.1 Extração simultânea de micotoxinas do cultivo microbiano	95
3.2 Atividade antifúngica de composto natural (γ -orizanol) e sintéticos (azoxistrobina e trifloxistrobina) contra <i>F. graminearum</i> CQ244	98

3.3 Atividade antimicotoxinas de composto natural (γ -orizanol) e sintéticos (azoxistrobina e trifloxistrobina) contra <i>F. graminearum</i> CQ244	103
4 CONCLUSÃO.....	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
ARTIGO 4.....	110
COMPLEXO <i>Fusarium graminearum</i> : INIBIÇÃO DO DESENVOLVIMENTO, DA PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS E DA EXPRESSÃO GÊNICA POR COMPOSTOS NATURAIS E SINTÉTICOS.....	111
RESUMO	111
1 INTRODUÇÃO.....	111
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	113
2.1 Matérias-primas utilizadas para extração dos compostos naturais.....	113
2.2 Linhagens do Complexo <i>Fusarium graminearum</i>	113
2.3 Obtenção dos antifúngicos.....	114
2.4 Testes prévios da concentração dos compostos naturais contra <i>Fusarium</i>	114
2.5 Inibição de linhagens do Complexo <i>F. graminearum</i> e da manifestação do seu potencial toxigênico por extratos naturais	115
2.6 Expressão dos genes envolvidos na síntese dos tricotecenos	116
2.6.1 Cultivo e isolamento de RNA.....	116
2.6.2 Teste de eficiência dos iniciadores	116
2.6.3 Análise das amostras	117
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	117
3.1 Testes prévios da concentração dos compostos naturais contra <i>Fusarium</i>	117
3.2 Inibição de linhagens do Complexo <i>F. graminearum</i> e da manifestação do seu potencial toxigênico por extratos naturais	119
3.3 Expressão dos genes envolvidos na síntese dos tricotecenos	129
4 CONCLUSÃO.....	130
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131
CAPÍTULO IV.....	136
4 CONCLUSÃO.....	137
5 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	138
CAPÍTULO V	139
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	140
ANEXOS.....	155

ANEXO 1 - Consulta Pública nº 77, de 19 de outubro de 2005.....	156
Limites máximos residuais de azoxistrobina.....	156
ANEXO 2 - Consulta Pública nº 57, de 17 de julho de 2003.....	157
Limites máximos residuais de trifloxistrobina	157
ANEXO 3 - Limites máximos residuais de micotoxinas em alimentos	158
Resolução - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011	158
Resolução – RDC nº 59, de 26 de dezembro de 2013.....	158
ANEXO 4 – Determinações de glicosamina, ergosterol e atividade enzimática	159
ANEXO 5 – Método de extração de micotoxinas - QuEChERS modificado (VACLAVICK et al., 2010)	160
_Toc391195750	

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Exemplos de micotoxinas e seus principais fungos produtores, <i>commodities</i> afetados e efeitos biológicos no homem e animais.	11
Tabela 3. Classes toxicológicas dos agrotóxicos com base na DL50.....	18
Tabela 2. Alguns fungicidas utilizados em lavouras de arroz.	20
Tabela 4. Solubilidade do γ -orizanol.....	23

CAPÍTULO III

ARTIGO 1

Tabela 1. Métodos de extração avaliados para extração de γ -orizanol.	52
Tabela 2. Valores dos níveis codificados e reais usados no CCRD.	52
Tabela 3. Valores codificados e reais e a resposta do conteúdo de γ -orizanol.....	56
Tabela 4. Principais efeitos e análise de interação para o conteúdo de γ -orizanol.....	57
Tabela 5. ANOVA para o conteúdo de γ -orizanol para CCRD.....	58

ARTIGO 2

Tabela 1. Fases móveis usadas para separação dos ácidos fenólicos.	70
Tabela 2. Composição centesimal (%) das sementes de nim e do farelo de arroz.	73
Tabela 3. Composição em ácidos graxos (%) do extrato de γ -orizanol do farelo de arroz.	76
Tabela 4. Curvas analíticas e suas linearidades.	74
Tabela 5. Equações das curvas analíticas e suas linearidades.	77
Tabela 6. Percentual de atividade sequestradora de radical livre (DPPH•) no período de 0-180 min.....	79
Tabela 7. Poder redutor dos extratos.	81

ARTIGO 3

Tabela 1. Matriz do planejamento experimental com os valores reais e codificados. ...	92
Tabela 2. Massa dos padrões usados para curva cromatográfica em HPTLC.....	93
Tabela 3. Recuperação em HPTLC para NIV, DON e ZEA.	96
Tabela 4. Medidas do desenvolvimento de <i>F. graminearum</i> CQ244 em presença e ausência de antifúngicos.	102

Tabela 5. Micotoxinas NIV, DON e ZEA.....	104
---	-----

ARTIGO 4

Tabela 1. Linhagens de <i>F. graminearum</i> analisadas neste trabalho.....	113
Tabela 2. Inibições verificadas nos testes prévios de diferentes concentrações de compostos naturais contra <i>Fusarium</i>	118
Tabela 3. Faixa de inibição indicada pela medida do halo do 3° ao 30° dia (%)......	120
Tabela 4. Inibição fúngica indicada pela produção de glicosamina (%).	120
Tabela 5. Inibição fúngica indicada pela produção de ergosterol (%).	121
Tabela 6. Equações das curvas analíticas dos padrões de micotoxinas e suas linearidades.....	125
Tabela 7. Micotoxinas DON, 15AcDON, 3AcDON, NIV e ZEA (µg/kg) nos intervalos 3°, 7°, 14°, 24° e 30° dias de desenvolvimento do fungo.	127

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1. Estrutura química dos tricotecenos.	12
Figura 2. Estrutura química da zearalenona.	13
Figura 3. Estrutura química dos quatro componentes majoritários do γ -orizanol.....	22
Figura 4. Árvore nim (<i>Azadirachta indica</i> A. Juss).	24
Figura 5. Biossíntese de terpenos.	25
Figura 6. Estabilização do radical livre DPPH.	28
Figura 7. Estabilização do radical ABTS.+ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.....	29
Figura 8. Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe^{3+}	31

CAPÍTULO III

ARTIGO 1

Figura 1. Métodos de extração de γ -orizanol e seus rendimentos (n = 3).	55
Figura 2. Diagrama de contorno do conteúdo de γ -orizanol como função da proporção e volume de hexano:isopropanol.	59
Figura 3. Espectro de absorção do γ -orizanol em hexano (a) e isopropanol (b).	60
Figura 4. Concentração de γ -orizanol ($\mu g g^{-1}$) em hexano (a) e isopropanol (b) armazenado em diferentes temperaturas: ambiente ($25 \pm 5^{\circ}C$), freezer ($-18 \pm 2^{\circ}C$) e refrigeração ($10 \pm 2^{\circ}C$) por 72 dias.	61

ARTIGO 2

Figura 1. Cromatograma do γ -orizanol padrão (A) e do extrato do farelo de arroz (B). 75	
Figura 2. Cromatogramas do extrato fenólico do farelo de arroz (a), extrato fenólico das sementes de nim (b) e dos padrões de ácidos fenólicos (gálico, cafeico, ferúlico, salicílico, trans cinâmico) (c).....	75
Figura 3. Atividade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC) em $mmol_{trolox}/g_{extrato}$. 80	
Figura 4. Inibição do escurecimento enzimático (%).	82

ARTIGO 3

Figura 1. Estrutura dos componentes majoritários do γ -orizanol (A), do azoxistrobina (B) e do trifloxistrobina (C).....	94
---	----

Figura 2. Cromatograma do HPTLC contendo os padrões em ordem crescente de concentração (6 primeiros pontos) e os 14 experimentos do planejamento descritos na Tabela 3.	97
Figura 3. Halos no 3° dia de crescimento de <i>F. graminearum</i> CQ244 nos meios: (a) controle; (b) contendo os fungicidas azoxistrobina (0,2 mg/kg) e trifloxistrobina (0,4 mg/kg), respectivamente e (c) contendo γ -orizanol nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,6; 0,8 e 1,0 g/kg, respectivamente.	98
Figura 4. Halos no 7° dia de crescimento de <i>F. graminearum</i> CQ244 nos meios: (a) controle; (b) contendo os fungicidas azoxistrobina (0,2 mg/kg) e trifloxistrobina (0,4 mg/kg), respectivamente e (c) contendo γ -orizanol nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,6; 0,8 e 1 g/kg, respectivamente.	100
Figura 5. Taxa de desenvolvimento do <i>F. graminearum</i> CQ244 (cm/dia).	101

ARTIGO 4

Figura 1. Inibição (%) da atividade da α -amilase do <i>F. graminearum</i> (08Tr031) (A), <i>F. asiaticum</i> (09Ar004) (B), <i>F. meridionale</i> (07Cv001) (C) pelos antifúngicos.	122
Figura 2. Inibição (%) da atividade de proteases do <i>F. graminearum</i> (08Tr031) (A), <i>F. asiaticum</i> (09Ar004) (B), <i>F. meridionale</i> (07Cv001) (C) pelos antifúngicos.	123
Figura 3. Cromatograma dos padrões de micotoxinas no detector A (ZEA) e B (DON, 15AcDON, 3AcDON e NIV).	126
Figura 4. Micotoxina DON (μ g/kg) e expressão relativa das linhagens de <i>F. graminearum</i> estudadas.	130

CAPÍTULO I

Inibição de linhagens do complexo *Fusarium graminearum* por compostos naturais e sintéticos

RESUMO

Quando produtos alimentícios e especiarias são contaminados por micotoxinas é quase impossível detoxificar utilizando processos usuais da indústria de alimentos ou durante o preparo doméstico. Por isso, controlar o crescimento do fungo e a produção de toxinas é uma demanda para garantir a segurança alimentar. Os agrotóxicos são rotineiramente utilizados como estratégia para proteger as plantas de doenças provocadas pela contaminação fúngica. No entanto, eles estão associados a efeitos adversos ao sistema nervoso central e periférico, têm ação imunodepressora e são cancerígenos. Em virtude disso, o objetivo deste trabalho foi estudar a inibição do desenvolvimento, do potencial toxigênico e da expressão gênica de linhagens do Complexo *Fusarium graminearum* por compostos naturais comparativamente aos fungicidas azoxistrobina e trifloxistrobina. Do farelo de arroz, foram extraídos o γ -orizanol e os ácidos fenólicos (EFF). Das sementes de nim foram extraídos os ácidos fenólicos (EFN), totalizando três extratos naturais. A capacidade antioxidante dos extratos foi verificada pelo consumo do radical livre DPPH[•], capacidade de captura do radical ABTS^{•+}, redução do ferro e inibição da oxidação enzimática. Os mecanismos de inibição de três linhagens de *F. graminearum* foram avaliados através da determinação de compostos estruturais (glicosamina e ergosterol) e da atividade de enzimas do metabolismo primário (α -amilase e proteases). Foram determinadas as micotoxinas de *Fusarium*: deoxinivalenol (DON), 15 acetildeoxinivalenol (15AcDON), 3 acetildeoxinivalenol (3AcDON), nivalenol (NIV) e zearalenona (ZEA). A expressão dos genes *Tri1* e *Tri5* foi determinada a fim de verificar se ocorria modificação da expressão gênica nas linhagens do Complexo *F. graminearum* ocasionada pela presença dos antifúngicos. O EFF apresenta atividade antioxidante destacada em relação aos demais extratos naturais para inibir a iniciação do processo, a propagação do radical livre e a catálise enzimática. A presença dos compostos naturais mostrou efeito promissor como antifúngico para as linhagens, sendo que a concentração necessária para inibir 50% do crescimento radial das colônias (MIC₅₀) foi 0,9 g/kg para γ -orizanol; 0,032 g/kg para EFF e 0,037 g/kg para EFN, portanto, os extratos fenólicos são mais eficazes para inibição de *F. graminearum* do que o γ -orizanol. Os extratos naturais afetaram as atividades das enzimas α -amilase e proteases. Também ocorreu a redução da formação de componentes estruturais (glicosamina e ergosterol). Os extratos naturais se destacaram pela capacidade de inibição de micotoxinas produzidas pela biomassa fúngica, com destaque para o EFN sobre a produção de DON, 15AcDON, 3AcDON e ZEA. Sendo assim, é possível dizer que há uma relação direta entre a atividade antioxidante na inibição do fungo e na manifestação do seu potencial toxigênico. Além disso, esse estudo contribuiu com a elucidação do mecanismo de ação dos antifúngicos naturais estudados. Ocorre modificação na expressão gênica quando a linhagem é submetida ao tratamento com antifúngico, havendo uma relação direta entre a expressão do gene *Tri5* e a produção de DON.

Palavras-chave: farelo de arroz, sementes de nim, azoxistrobina, trifloxistrobina, antioxidante, micotoxinas.

Inhibition of *Fusarium graminearum* complex strains by natural and synthetic compounds

ABSTRACT

When food products and spices are contaminated by mycotoxins is almost impossible to detoxify using usual processes of the food industry or during home preparation. Therefore, controlling the fungus growth and toxin production is a demand to ensure food safety. The pesticides are routinely used as a strategy to protect plants from diseases caused by fungal contamination. However, they are associated with adverse effects on the central and peripheral nervous system effects, have immunosuppressive action and are carcinogenic. As a result, the aim of this work was to study the inhibition of the development, toxigenic potential and gene expression of *F. graminearum* complex strains by natural compounds compared to azoxystrobin and trifloxystrobin fungicides. Of the rice bran were extracted the γ -oryzanol and phenolic acids (EFF). Of the neem seeds were extracted phenolic acids (EFN) totaling three natural extracts. The antioxidant activity of the extracts was measured by consumption of free radical DPPH•, ability to capture the radical ABTS•⁺, iron reduction and inhibition of enzymatic oxidation. The mechanisms of inhibition of three strains of *F. graminearum* were assessed by determining structural compounds (glucosamine and ergosterol) and activity of enzymes of the primary metabolism (α -amylase and protease). We determined the *Fusarium* mycotoxins: deoxynivalenol (DON), 15 acetyldeoxinivalenol (15AcDON), 3 acetyldeoxinivalenol (3AcDON), nivalenol (NIV) and zearalenone (ZEA). Expression of *Tri1* and *Tri5* genes was determined in order to verify if gene modification occurred in *F. graminearum* complex strains caused by the presence of antifungals. The EFF offers outstanding antioxidant activity compared to other natural extracts to inhibit the initiation of the process, the propagation of free radical and enzymatic catalysis. The presence of natural compounds showed promise as an antifungal effect to the strains, and the concentration required for 50% inhibition of radial growth of colonies (MIC₅₀) was 0.9 g/kg for γ -oryzanol; 0.032 g/kg to EFF and 0.037 g/kg to EFN, thus, phenolic extracts are more effective for *F. graminearum* inhibition than γ -oryzanol. The natural extracts affected the α -amylase and protease activities. Also there was a reduction in the formation of structural components (glucosamine and ergosterol). The natural extracts stood out for its ability to inhibit mycotoxin produced by fungal biomass, especially the EFN on the production of DON, 15AcDON, 3AcDON and ZEA. Thus, is possible to say that there is a direct relationship between the antioxidant activity in fungus and in their toxigenic potential inhibition. Furthermore, this study contributed to the elucidation of the action mechanism of natural antifungals studied. Gene modification occurs when the strain is subjected to antifungal treatment, there is a direct relationship between the expression of *Tri5* gene and DON production.

Keywords: rice bran, neem seeds, azoxystrobin, trifloxystrobin, antioxidant, mycotoxins.

1 INTRODUÇÃO

A contaminação dos alimentos por fungos causa mudanças na composição química, estrutura e aparência, representando perda econômica e desperdício de matéria-prima e alimentos. Além disso, algumas espécies fúngicas produzem micotoxinas em condições de estresse, causando danos à saúde de humanos e animais (EZEKIEL et al., 2014).

Os fungos toxigênicos pertencem basicamente aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, que são responsáveis pela produção da maioria dos metabólitos secundários tóxicos até hoje conhecidos e estudados. As espécies de *Fusarium* são patógenos de plantas, produzindo micotoxinas antes ou imediatamente após a colheita. Os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* são mais frequentes como contaminantes em matérias-primas durante a secagem e o armazenamento, e por isso são denominados de fungos de armazenamento (FILHO et al., 2013; SWEENWEY; DOBSON, 1998).

Os fungicidas têm sido bastante usados com o objetivo de proteger as plantas de doenças provocadas por contaminação fúngica (PEREIRA, 2009). Estes compostos integram o conjunto das substâncias “xenobióticas” (estranhas ao organismo) cujos resíduos são agentes tóxicos para animais de criação e humanos, nos quais provocam diversos sinais ou sintomas, nem sempre específicos, denominados intoxicação (COUTINHO, 2000). Dentre os efeitos adversos estão danos ao sistema nervoso central e periférico, ação imunodepressora e carcinogenicidade (ECOBICHON, 1993). Nesse sentido torna-se interessante o estudo de compostos extraídos de fontes naturais com propriedades antifúngicas, como por exemplo, os compostos fenólicos, que vêm sendo bastante estudados como uma alternativa em substituição aos fungicidas sintéticos (PAGNUSSATT et al., 2014; SOUZA et al., 2012).

O farelo de arroz é amplamente conhecido por seus componentes com atividade antioxidante, como o γ -orizanol e os ácidos fenólicos, também denominados fitoquímicos (BIERHALS et al., 2009; HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2012; SOUZA et al., 2011). As sementes de nim, obtidas de uma árvore que pertence a família *Meliaceae*, contém compostos capazes de conferir proteção aos lipídeos da membrana de mitocôndrias submetidas ao estresse oxidativo (CHAVES et al., 2013; PAVIANI, 2010; RIBEIRO, 2013).

Assim, estas espécies distintas são fontes de compostos bioativos exploradas pelo seu poder de limitar os danos do estresse oxidativo, mas pouco exploradas como estratégia para controle de contaminantes fúngicos na cadeia produtiva de cereais.

Tendo em vista que estudos para elucidar o comportamento de espécies toxigênicas mediante antifúngicos naturais são necessários, foi desenvolvido este trabalho, que busca contribuir com a segurança alimentar estudando fontes naturais com poder antioxidante demonstrado pelos extratos de farelo de arroz e sementes de nim.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência de compostos naturais e sintéticos no crescimento fúngico, na produção de micotoxinas e na expressão gênica de linhagens do Complexo *Fusarium graminearum*.

2.2 Objetivos específicos

- Padronizar método de extração e determinação de γ -orizanol do farelo de arroz;
- Caracterizar componentes fitoquímicos do farelo de arroz (γ -orizanol e ácidos fenólicos) e das sementes de nim (ácidos fenólicos) bem como verificar a capacidade antioxidante desses compostos;
- Verificar a atividade de γ -orizanol no desenvolvimento de *Fusarium graminearum* CQ244 e a manifestação do potencial toxigênico;
- Estudar o efeito da aplicação de antifúngicos naturais e sintéticos no desenvolvimento de linhagens de *F. graminearum*, na manifestação do seu potencial toxigênico e nos genes de expressão *Tri1* e *Tri5*.

CAPÍTULO II

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Fungos toxigênicos e micotoxinas em alimentos

3.1.1 Fungos toxigênicos

A contaminação dos alimentos por fungos causa mudanças na composição química, estrutura e aparência, representando perda econômica e desperdício de matéria-prima e alimentos. Além disso, algumas espécies fúngicas produzem micotoxinas em condições de estresse, causando danos à saúde de humanos e animais de criação (EZEKIEL et al., 2014).

Os fungos toxigênicos pertencem basicamente aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, os quais são responsáveis pela produção da maioria dos metabólitos secundários tóxicos até hoje conhecidos e estudados. As espécies de *Fusarium* são patógenos de plantas, que produzem micotoxinas antes ou imediatamente após a colheita. Os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* são mais frequentes como contaminantes de produtos durante a secagem e o armazenamento, sendo por isso denominados de fungos de armazenamento (FILHO et al., 2013; SWEENWEY; DOBSON, 1998).

Fusarium graminearum Schwabe é a fase imperfeita ou assexuada de um ascomiceto que produz esporos assexuais conhecidos por macroconídios, geralmente multisseptados e fusiformes produzidos a partir de esporodóquios. Em sua fase sexuada, *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch, produz ascósporos, ou esporos sexuais, em corpos de frutificação denominados peritécios. Ambos os tipos de esporos funcionam como propágulos que podem iniciar epidemias de grande impacto em cultivos de cereais como o trigo, a aveia e o milho. A eventual redução no rendimento da cultura, o efeito negativo em atributos de qualidade do produto, juntamente com a presença de micotoxinas como resultado da colonização do fungo no hospedeiro, eleva o status do *F. graminearum* ao grupo dos mais importantes e estudados patógenos de plantas da atualidade (ASTOLFI et al., 2010; GOSWAMI; KISTLER, 2004; KLIX, BEYER; VERREET, 2008).

Avanços em estudos com métodos moleculares têm permitido determinar novas linhagens e espécies filogenéticas dentro do chamado Complexo *F. graminearum*, além de ter acelerado o conhecimento sobre a diversidade genética das populações e no potencial toxigênico com implicações em epidemiologia e toxicologia (ASTOLFI et al., 2010).

Espécies de fungos podem ser definidas de acordo com conceitos baseados na morfologia, ecologia, biologia ou filogenia (LESLIE; BOWDEN, 2008). No caso de *F. graminearum*, todos esses conceitos têm sido considerados de modo a estabelecer os limites entre espécies (TAYLOR et al., 2000). O mais recentemente utilizado na classificação é o conceito de “espécie filogenética”. Nesse caso, um grupo de indivíduos que compartilha a mesma tendência evolutiva e uma origem em comum (ancestral comum), é considerado um grupo monofilético, também chamado de clado, o qual compartilha uma herança evolutiva em comum (TAYLOR et al., 2000). Desta forma, variantes na sequência de DNA de genes informativos sobre a filogenia são utilizados para rastrear novas espécies em uma coleção de isolados ou uma população de fungos (LESLIE, ZELLER; SUMMERELL, 2001).

Os fungos do gênero *Fusarium* causam danos às plantações e prejuízos que geram perdas de bilhões de dólares no mundo. Além disso, a ingestão de alimentos que contenham micotoxinas produzidas por este fungo pode causar grandes prejuízos para saúde humana e vegetal (LEAL et al., 2005).

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. *Fusarium* 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 frequentes são queratites, úlceras, de pele, micetomas, osteomielites e osteoartrites. Em humanos, o fungo geralmente penetra pela pele ou conjuntiva ocular, levando a efeitos sistêmicos, principalmente em imunocomprometidos, com potencial carcinogênico, que podem levar à morte (LEAL et al., 2005).

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 e são comumente relatadas em arroz (BECKER-ALGERI et al., 2013; HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2011; PARK, et al., 2005; SIFOU et al., 2011). 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).

Estudos 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 micro-organismos que tenham antagonismo competitivo ao *Fusarium* (LEAL et al., 2005). Além disso, a literatura cita trabalhos que utilizaram antifúngicos naturais, como forma de reduzir a severidade causada pelo fungicida na planta e proporcionar um método saudável de preservação das culturas (PAGNUSSATT et al., 2014; SOUZA et al., 2012).

3.1.2 Micotoxinas

As micotoxinas provêm do metabolismo secundário de fungos toxigênicos, cujas principais características são: amplo espectro de toxicidade, baixo peso molecular, não-imunogenicidade, termo-estáveis e atuam em baixas concentrações (BOK et al., 2004). O estresse, desbalanço de nutrientes e as condições ambientais propiciam o desenvolvimento de micotoxinas pelas espécies toxigênicas (SWEENEY; DOBSON, 1998). A maioria das micotoxinas afeta órgãos e tecidos, induzindo várias patologias, tais como neoplasia, mutagênese, teratogênese, imunossupressão entre outras (FERNANDES, 2004). Os principais órgãos afetados são conhecidos para algumas micotoxinas dentre elas estão: aflatoxinas o fígado; zearalenona o sistema reprodutor; ocratoxinas A e citrinina os rins, fumonisinas os pulmões; tricotecenos o trato digestório e sistema imunológico (TANAKA, 2001).

A formação de micotoxinas é afetada pelos mais diversos fatores que podem ser classificados como biológicos, físicos e químicos ou ainda macro e micro ambientais tais como: conteúdo de umidade, temperatura, injúria mecânica, tempo, aeração (dióxido de carbono, oxigênio), natureza do substrato, nutrientes minerais, tratamento químico e suscetibilidade da planta, infestação por insetos e ecossistema microbiano (MELLO; MACDONALD, 1997; YOSHIZAWA, 2001). As micotoxinas podem estar presentes em um alimento independente deste apresentar crescimento fúngico aparente, podendo persistir mesmo após a morte dos fungos (BAPTISTA, HORII; BAPTISTA, 2004; MOSS, 1992).

As manifestações da toxicidade em animais são tão diversas quanto o tipo de fungo que sintetiza estes metabólitos secundários e ainda é dependente da dose, do organismo afetado, sexo, idade e espécies de animais. A exposição indireta de humanos as micotoxinas ocorre quando os resíduos tóxicos dessas toxinas ou ainda seus

derivados persistem em produtos de origem animal ou vegetal, e estes são consumidos (MELLO; MACDONALD, 1997; YOSHIZAWA, 2001).

As micotoxinas mais frequentes 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, 2004). A Tabela 1 mostra exemplos de micotoxinas, os principais produtos afetados e os efeitos biológicos no homem e animais.

Tabela 1. Exemplos de micotoxinas e seus principais fungos produtores, *commodities* afetados e efeitos biológicos no homem e animais.

Micotoxinas	Fungos produtores	<i>Commodities</i> contaminados	Efeitos em animais	Efeitos no homem
Aflatoxina (B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ e M ₁)	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Amendoim, pistache, milho amêndoa, leite e seus derivados	Hepatotoxicidade, Hepatocarcinoma e hemorragia	Hepatocarcinogênese, cirrose em crianças, síndrome de Reye, degeneração da gordura de vísceras
Ocratoxina A	<i>Aspergillus alutaceus</i> <i>Penicillium verrucosum</i>	Grãos de café, arroz, cevada, produto animal (rins, carne)	Nefrotóxico e hepatotóxico	Nefropatia de Balkan, tumor renal
Patulina	<i>Penicillium expansum</i>	Maçã, suco de maçã	Hepatotóxico, afeta rins, baço e cérebro	Provável ação carcinogênica, mutagênica, teratogênica e fetotóxica
Tricotecenos (deoxinivalenol, nivalenol, toxina T-2)	<i>Fusarium graminearum</i>	Trigo, cevada, arroz, sorgo	Vômito, diarreia, perda de peso, descamação da pele e hemorragia	ATA (aleucia tóxica alimentar)
Zearalenona	<i>Fusarium graminearum</i>	Milho, sorgo, trigo	Efeitos estrogênicos, infertilidade LEME	Câncer cervical
Fumonisinias (B ₁ , B ₂ e B ₃)	<i>Fusarium moniliforme</i> <i>Fusarium proliferatum</i>	Milho e seus derivados	(leucoencefalomalácia eqüina), edema pulmonar em suínos	Câncer de esôfago

Fonte: GONÇALEZ et al., (2001).

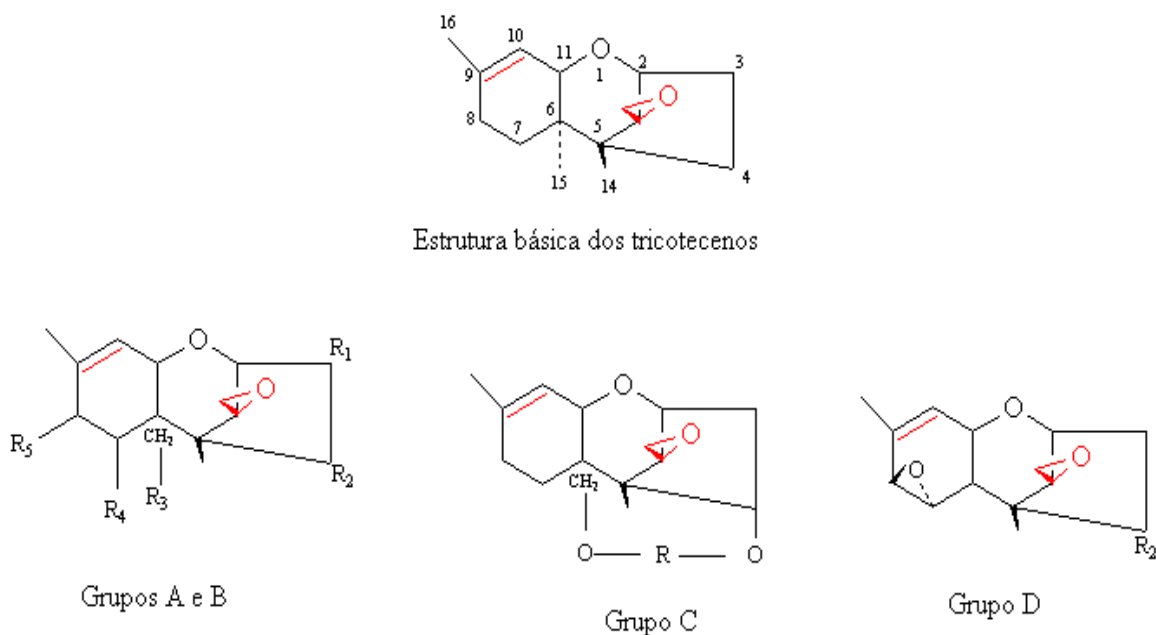
3.1.2.1 Tricotecenos

Os tricotecenos são produtos do metabolismo secundário de fungos dos gêneros *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trichothecium*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium* e *Stachybotrys* (SWEENWEY; DOBSON, 1998). A contaminação com estas micotoxinas ocorrem em temperatura entre 0 e 35°C e umidade relativa entre 80 e 90% (BADIALE-FURLONG, 2000).

Os tricotecenos (12,13-epoxitricotecenos) são um grupo de mais de cem micotoxinas e possuem esse nome devido a sua estrutura química, composta por um anel com esqueleto tetracíclico 12,13-epoxitricotecenos (SANTIN, 2000). Apresentam uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 10 e podem ser classificados em 4 grupos (A, B, C e D) (Figura 1).

No grupo A estão os tricotecenos cuja posição 8 tem como substituintes grupos acilados ou hidroxilas, incluindo assim toxina T-2, toxina HT-2, neosolaniol e diacetoxiscirpenol (DAS). O grupo B é constituído por compostos onde na posição 8 está um grupamento cetônico, incluindo o deoxinivalenol (DON, vomitoxina), nivalenol e fusarenona-x. Os tricotecenos do tipo C possuem dois grupamentos epóxidos, como a crotocina. O grupo D é constituído pelos tricotecenos macrocíclicos, onde estão a roridina, a verrucarina e a satratoxina. A síntese dos grupos A e B parece ser característica particular do gênero *Fusarium* (MELLO; MACDONALD, 1997).

Figura 1. Estrutura química dos tricotecenos.



Fonte: SYDENHAM; THIEL, (1996).

O grupo epóxido e a dupla ligação na posição 9 e 10 são os elementos fundamentais para a toxicidade dos tricotecenos, no entanto, os outros substituintes, suas posições e tamanhos também influenciam no grau de toxicidade (TANAKA et al., 2000).

Essas substâncias são descritas como potentes irritantes da pele e agentes inflamatórios com rápida destruição das células em divisão (MIROCHA; PATHRE, 1973).

Os tricotecenos são responsáveis por vários tipos de micotoxicoses em animais, causando vários efeitos adversos à saúde. Eles também são causadores de algumas doenças no homem. O deoxinivalenol (DON) e a toxina T-2 são os tricotecenos mais potentes (CERVERÓ et al., 2007).

Os tricotecenos são, em geral, compostos muito estáveis durante a moagem, o armazenamento, o cozimento e o processamento de grãos, pois não se degradam nem mesmo em altas temperaturas (ERIKSEN; ALEXANDER, 1998).

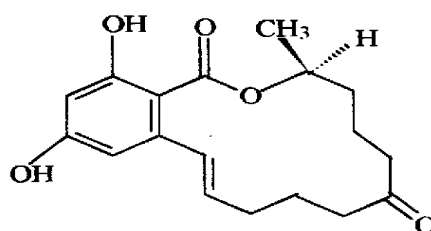
Os tricotecenos não são voláteis e podem ser desativados sob condições drásticas ácidas ou alcalinas, em presença de hidretos de alumínio, lítio ou peróxidos e hidratação em autoclave, onde o anel epóxido pode sofrer abertura. A enzima epóxido hidrase também é capaz de abrir o anel e produzir glicóis. Fungos e bactérias podem também alterar a estrutura dos tricotecenos, detoxificando-o (GARDA-BUFFON; BADIALE-FURLONG, 2008).

3.1.2.2 Zearalenona

A zearalenona (ZEA) (Figura 2) é um metabólito estrogênico produzido por espécies de *Fusarium* (AKIYAMA, 2001; STROKA, 2000).

Como a maioria dessas espécies fúngicas também são produtoras de outras toxinas, como DON, NIV e T-2, é pouco provável encontrar apenas a ZEA em matrizes contaminadas com fungos do gênero *Fusarium* (SMITH; HENDERSON, 1991).

Figura 2. Estrutura química da zearalenona.



Fonte: SHIER, (1998).

A zearalenona é sintetizada pela via do acetato-polimalonato, resultando na condensação de unidades de acetato dentro de um poliquetídeo, que requer relativamente pequenas modificações para completar a conversão para a molécula final da toxina (SHIER, 1998). Essa toxina tem efeito estrogênico em animais, incluindo infertilidade, aumento do útero e glândulas mamárias, atrofia dos testículos e ovários (D'MELLO et al., 1999; GAUMY et al., 2001; HOLLINGER et al., 1999).

A zearalenona não é conhecida por ser um composto com alta toxicidade, pois em uma única dosagem de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em camundongos e ratos e 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em aves não causou mortalidade (YOSHIZAWA, 2001).

3.1.2.3 Métodos de determinação de toxinas de *Fusarium*

Vários métodos podem ser utilizados para detecção e quantificação de micotoxinas, dentre esses se destacam os cromatográficos (cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa) e os métodos imunoençaios (ELISA e radioimunoensaio) (SALEM; AHMAD, 2010; TURNER et al., 2009).

A detecção e a determinação de micotoxinas devem ser realizadas por métodos sensíveis e específicos, pois além de ocorrerem em níveis de ng g^{-1} (ppb), constituem também um grupo de estruturas semelhantes exigindo métodos que além de separá-las, também confirme suas identidades. Além disso, os métodos também devem ser rápidos, confiáveis e economicamente viáveis (HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2012; MAROCHI et al., 1996). O desenvolvimento de um método para a análise de micotoxinas é dificultado por diversos fatores, tais como tempo, grande volume de solventes, várias etapas de extração, tornando a análise extremamente laboriosa. Um procedimento analítico para determinação de micotoxinas inclui, normalmente, quatro etapas: preparo de amostra, a extração, *clean up* e determinação cromatográfica para identificação e quantificação (PALMA et al., 2007).

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). Os tricotecenos são de difícil detecção em virtude de vários aspectos físico-químicos. Um deles é a grande faixa de polaridade dos componentes do grupo que dificulta a extração da matriz, sendo necessário o emprego de solventes que arrastam também uma série de compostos interferentes. A ocorrência simultânea de

tricotecenos com diferentes níveis de toxicidade torna importante a quantificação separada, sendo os métodos cromatográficos os mais indicados (SYNDER, 1986).

Algumas etapas analíticas são consideradas importantes nos métodos utilizados na determinação de micotoxinas em alimentos, por exemplo, a de preparo da amostra, extração com solvente, limpeza do extrato, triagem, confirmação e quantificação (GILBERT, 1999; TANAKA, 2001).

O emprego de acetonitrila como solvente de extração no método QuEChERS proporciona uma menor quantidade de coextrativos lipofílicos provenientes da amostra quando se trabalha, como por exemplo, com cereais, gorduras e pigmentos. Também, a extração de uma ampla faixa de compostos com diferentes polaridades e, a compatibilidade do extrato final com a Cromatografia Líquida e com a Cromatografia Gasosa. Além disso, a acidificação da acetonitrila permite recuperações satisfatórias de compostos que geralmente apresentam problemas de estabilidade (PRESTES et al., 2009).

A adição de sais na etapa de partição promove o efeito “*salting out*” propiciando melhores percentuais de recuperação para analitos polares, uma vez que, a adição de sais diminui a solubilidade destes compostos na fase aquosa, assim como a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa. O sal secante $MgSO_4$ tem grande capacidade de remover água quando comparado a outros sais (PRESTES et al., 2009).

Entre as principais vantagens do método QuEChERS com relação aos métodos tradicionais de extração estão: os altos valores de recuperações para uma ampla faixa de compostos; elevado grau de exatidão e precisão dos resultados; preparo de um grande número de amostra em um tempo reduzido; redução no volume de solventes orgânicos; simplicidade de execução (LEHOTAY et al., 2005).

O método oficial descrito na *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) para análise quantitativa de micotoxinas envolve a determinação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a diferentes tipos de detectores que permitem determinar uma extensa variedade de compostos químicos e biológicos, além de ser aplicada na análise de rotina em muitas áreas do conhecimento (FURLANI et al., 1999; SHEPHARD, 1996; SYDENHAM; POPPI et al., 2007).

3.1.2.4 Legislação para micotoxinas de *Fusarium*

No Brasil, os níveis de micotoxinas são regulados pela Resolução da Anvisa RDC N° 7 de 2011. O limite aceitável para DON em trigo integral, trigo para quibe,

farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada é de 2.000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, e para ZEA varia entre 200 a 1000 dependendo do tipo de alimento (ANVISA, 2011).

De acordo com a Resolução da Anvisa (RDC N° 59, DE 26 DE DEZEMBRO DE 2013), em 2017 os limites se tornam mais rígidos passando para 750 a 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para DON e 100 a 600 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para ZEA.

Na Europa, foi estabelecido 1.250 $\mu\text{g kg}^{-1}$ como limite máximo permitido para cereais destinados ao consumo humano para DON e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para ZEA (COMMISSION REGULATION, 2005).

3.2 Antifúngicos sintéticos

Os agrotóxicos são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas, bem como de ambientes urbanos, hídricos e industriais (MAPA, 2014).

A agricultura praticada no Brasil é bastante dependente de insumos químicos, dentre os quais os agrotóxicos que têm sido usados por mais de 40 anos devido a sua eficácia em controlar uma grande variedade de pragas, doenças e plantas daninhas que infestam as lavouras, garantindo assim uma maior produtividade e, conseqüentemente, um maior retorno econômico da atividade agrícola. Entretanto muitos questionamentos são feitos sobre a necessidade da utilização desses produtos na agricultura para gerar uma maior produção de alimentos, devido aos riscos que podem causar à saúde do consumidor e ao meio ambiente em geral (FARIA, 2004).

Apesar da criação de leis, portarias e resoluções na tentativa de controle e diminuição do uso de agrotóxicos, o que vem ocorrendo no Brasil é o aumento significativo do uso desses compostos, principalmente dos proibidos em outros países, pois os empresários do setor de defensivos agrícolas veem no Brasil uma oportunidade de continuidade de seu empreendimento, comercializando-os (COSTA, 2010).

Segundo dados da Anvisa, (2009) há crescimento da importação de agrotóxicos à medida que eles são proibidos em seus países. Como exemplos de agrotóxicos que aumentaram seu consumo no Brasil, após serem banidos em outros países, o parationa (banido da China em 2006) e o carbofuran (banido na União Européia em 2005) (COSTA, 2010).

O Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo e tem o maior mercado destes produtos em âmbito mundial, com 107 empresas autorizadas para registro de seus compostos químicos, respondendo por 16% do mercado mundial. A importação de agrotóxicos em nosso país cresceu 236% entre 2000 e 2007 (ANVISA, 2009).

De acordo com a Anvisa, os resultados do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) de 2013, mostraram que, das 589 amostras consideradas insatisfatórias (36% do total analisado), 520 apresentaram algum tipo de agrotóxico não autorizado para a cultura; 38 estavam com produtos tóxicos com nível acima do limite imposto pela Anvisa; e 31 amostras tinham resíduos tóxicos de produtos não autorizados para aquela cultura e com níveis de agrotóxico acima do limite.

Alguns estudos comprovaram que o aumento do uso de agrotóxicos, em determinadas culturas, aumentaram consideravelmente o número de pragas, surgindo inclusive outras espécies igualmente danosas (ALVES FILHO, 2002). Além disso, estudos revelaram que, em alguns casos, o emprego de fungicida acarreta maior contaminação com micotoxinas no grão do que quando a cultura não é submetida a tratamento químico (DORS, 2010; HÝSEK, 2005). Isso pode ser devido ao estresse do fungo pela adição dos produtos químicos, com consequente produção de micotoxinas. Sendo assim, a aplicação do fungicida nem sempre está relacionada com a redução de fungos e de micotoxinas no grão. Porém, o tratamento adequado das sementes com fungicidas pode ser favorável influenciando positivamente no desempenho das sementes no campo, protegendo a semente contra patógenos do solo durante a germinação e de patógenos da parte aérea na fase inicial do desenvolvimento da planta (NEERGAARD, 1979).

3.2.1 Riscos toxicológicos dos agrotóxicos

Existem três vias principais responsáveis pela contaminação direta em humanos por agrotóxicos (COSTA, 2010; MOREIRA et al., 2002; SOUZA, 2006):

A via ocupacional, que é caracterizada pela intoxicação do grupo de trabalhadores que lidam diretamente com os agrotóxicos, sendo responsável por mais de 80% dos casos de intoxicação. A via ambiental, que é caracterizada pela distribuição ou dispersão dos agrotóxicos, contaminando todos os segmentos ambientais, tais como: lençóis freáticos, rios, córregos, lagos, solos, contaminação atmosférica por meio da pulverização e contaminação da fauna e da flora. A via alimentar que tem como característica a contaminação por agrotóxicos devido à ingestão de produtos com

resíduos destes compostos que atinge uma parcela maior da população: os consumidores.

Os agrotóxicos integram o conjunto das substâncias “xenobióticas” (estranhas ao organismo) e são considerados agentes tóxicos. Todos apresentam um certo grau de toxicidade, podendo provocar danos aos organismos. A interação de um agente tóxico com o organismo provoca diversos sinais ou sintomas específicos e é denominada intoxicação (COUTINHO, 2000). Esses compostos podem causar efeitos adversos ao sistema nervoso central e periférico, ter ação imunodepressora ou ser cancerígeno (ECOBICHON, 1993).

A toxicidade da maioria dos agrotóxicos é expressa em valores referentes à DL₅₀, por via oral, representada por miligramas do ingrediente ativo do produto por quilograma de peso vivo, necessários para matar 50% da população de ratos ou de outro animal teste. A DL₅₀ é usada para estabelecer as medidas de segurança a serem seguidas para reduzir os riscos que o produto pode apresentar à saúde humana (SCHNEIDER, 2012).

Os agrotóxicos são agrupados em classes, de acordo com a sua toxicidade (Tabela 3) referente aos resultados de testes ou estudos realizados em laboratórios, estabelecidos pela portaria nº3/MS/SNVS, de 16 de janeiro de 1992, da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA, 1992).

Tabela 3. Classes toxicológicas dos agrotóxicos com base na DL50.

Classe	Classificação	Cor da faixa no rótulo da embalagem
I	Extremamente tóxico (DL ₅₀ menor que 50 mg.kg ⁻¹ peso vivo)	Vermelho vivo
II	Altamente tóxico (DL ₅₀ de 50 mg.kg ⁻¹ a 500 mg.kg ⁻¹ peso vivo)	Amarelo intenso
III	Medianamente tóxico (DL ₅₀ 500 mg.kg ⁻¹ a 5000 mg.kg ⁻¹ peso vivo)	Verde intenso
IV	Pouco tóxico (DL ₅₀ maior que 5000 mg.kg ⁻¹ peso vivo)	Verde intenso

Fonte: ANVISA, (1992).

O mercado consumidor de produtos *in natura* ou processados tem exigido requerimentos fitossanitários rigorosos, o que requer uma visão diferenciada de produção de alimentos, priorizando a segurança alimentar e do meio ambiente. Nesse enfoque, a qualidade do grão é de vital importância para a conquista de novos nichos de mercado, principalmente quando considerada em relação ao LMR aceito pelos países importadores e recomendado pelo *Codex Alimentarius* (FAO, 2009). Alimentos com resíduos químicos acima dos limites estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* podem causar enormes prejuízos aos produtores, visto a proibição imposta por mercados externos. Além disto, não oferecem segurança alimentar e ambiental para os consumidores internos. Assim, níveis de resíduos de agrotóxicos devem ser monitorados para evitar barreiras econômicas (EMBRAPA, 2005).

3.2.2 Fungicidas

Os agrotóxicos utilizados no Brasil são classificados de acordo com sua finalidade, sendo definidos pelo seu mecanismo de ação no alvo biológico, sendo os mais comuns, plantas daninhas, doenças e pragas de espécies agrícolas cultivadas. Neste mercado, os herbicidas (48%), inseticidas (25%) e fungicidas (22%) movimentam 95% do consumo mundial de agrotóxicos (TAVELLA et al., 2011).

Os fungicidas têm sido empregados por cerca de 200 anos com o objetivo de proteger as plantas de doenças provocadas por ataques de fungos (PEREIRA, 2009).

Nas áreas cultivadas são adotadas medidas preventivas e/ou corretivas contra diferentes pragas, sendo no caso de fungos pela utilização de fungicidas, porém a resposta à aplicação desses produtos é diferente para cada cultivar e é influenciada pelas condições meteorológicas durante o desenvolvimento da cultura, pela reação de resistência da cultivar, pela distribuição do princípio ativo nos tecidos vegetais e pela própria susceptibilidade da espécie fúngica contaminante (DALLAGNOL et al., 2006). Além disso, existe uma tendência mundial de redução do uso de agrotóxicos na lavoura, havendo a necessidade de novas estratégias, como por exemplo, a utilização de extratos naturais que, além de preservarem o meio ambiente, melhorem a qualidade e o rendimento das culturas, e sejam eficientes contra a produção de toxinas durante o cultivo.

A pressão de seleção exercida por fungicidas contribui para o surgimento de populações resistentes. A seleção e a recombinação são do ponto de vista populacional, mecanismos evolutivos que tem implicações para o manejo de doenças por interferirem

na predominância de indivíduos resistentes a fungicidas (REIS et al., 2006), portanto é necessário caracterizar populações para que se conheça seu potencial evolutivo (MCDONALD et al., 2002).

A Tabela 2 apresenta alguns dados de fungicidas utilizados em lavouras de arroz, do grupo estrobilurina (azoxistrobina e trifloxistrobina) e triazol (tebuconazole, propiconazole, ciproconazole).

Tabela 2. Alguns fungicidas utilizados em lavouras de arroz.

Fungicida	LMR* (mg kg ⁻¹)	Intervalo de segurança	Nº CAS**	Fórmula química	Classificação toxicológica
Azoxistrobina	0,1	30 dias	131860-33-8	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	Classe III
Trifloxistrobina	0,2	15 dias	141517-21-7	C ₂₀ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₄	Classe II
Tebuconazole	0,1	35 dias	107534-96-3	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	Classe IV
Propiconazole	0,1	45 dias	60207-90-1	C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₂	Classe II
Ciproconazole	0,03	42 dias	94361-06-5	C ₁₅ H ₁₈ ClN ₃ O	Classe III

Fonte: Anvisa, (2010). *LMR: limite máximo residual; **Número do *Chemical Abstracts Service*.

3.3 Antifúngicos naturais

Os fungicidas sintéticos são conhecidos como uma alternativa para reduzir os fungos em culturas e seu emprego tem aumentado, gerando preocupação ao consumidor em função de sua toxicidade residual estar sendo associada ao câncer, além da degradação ambiental e seleção de espécies microbianas resistentes (MARTINEZ-ROMERO et al., 2008).

A utilização de substâncias naturais, de origem vegetal, nas diferentes etapas de cultivo até o consumo, mesmo quando empregadas em concentrações relativamente elevadas, tornam o produto acabado mais atrativo. Além dos benefícios proporcionados à saúde, diversos estudos têm demonstrado o efeito inibidor de compostos de origem

vegetal no desenvolvimento de micro-organismos deteriorantes e patogênicos, veiculados por alimentos (PAGNUSSATT et al., 2013; SELVI et al., 2003).

3.3.1 Compostos fenólicos

Compostos extraídos de fontes naturais com propriedades antifúngicas vêm sendo bastante estudados como uma alternativa em substituição aos fungicidas. Dentre eles estão os compostos fenólicos, que têm mostrado atividade contra diversos fungos (PAGNUSSATT et al., 2014; SOUZA et al., 2011).

A presença de compostos fenólicos em plantas tem sido muito estudada por estes apresentarem atividades farmacológica e também por inibirem a oxidação lipídica e a proliferação de fungos (FERNANDEZ et al., 1998; PAGNUSSATT et al., 2014; SOUZA et al., 2011).

Os ácidos fenólicos são algumas das substâncias que constituem o grupo dos compostos fenólicos. Caracterizam-se por possuírem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes tanto para os alimentos como para o organismo, sendo, por isso, indicados para o tratamento e prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e outras (CROFT, 1998; FERGUSON; HARRIS, 1999).

Os ácidos fenólicos são divididos em três grupos. O primeiro é composto pelos ácidos benzóicos, que possuem sete átomos de carbono (C6-C1) e são os ácidos fenólicos mais simples e abundantes encontrados na natureza. O segundo é formado pelos ácidos cinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C6-C3), sendo sete os mais comumente encontrados no reino vegetal. As cumarinas são derivadas do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido o-cumárico (SOARES, 2002). O farelo de arroz e as sementes de nim são algumas das diversas fontes de ácidos fenólicos disponíveis na natureza (BIERHALS et al., 2009; CHAVES et al., 2013; SOUZA et al., 2011).

Os ácidos fenólicos, além de se apresentarem sob sua forma natural, podem também se ligar entre si ou com outros compostos (SOARES 2002). O γ -orizanol é uma complexa mistura de ésteres do ácido ferúlico com esteróis e alcoóis triterpênicos (BUCCI et al., 2003). Trata-se, portanto, de um composto derivado do ácido ferúlico, que é um derivado do ácido hidroxicinâmico (ANGELO; JORGE, 2007).

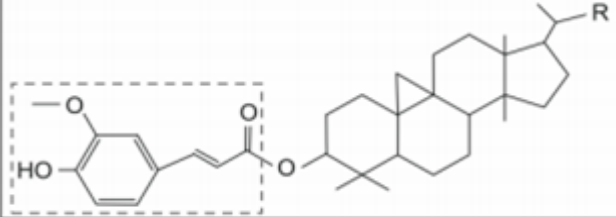
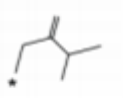
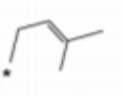
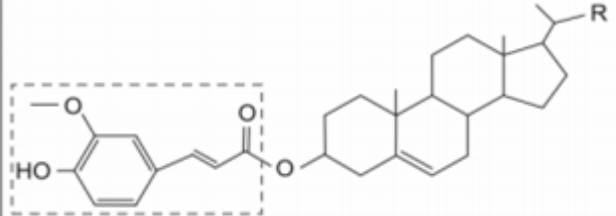
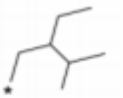
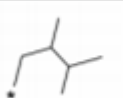
O γ -orizanol foi inicialmente encontrado no óleo de arroz em 1954. Como foi isolado do óleo obtido a partir do arroz (*Oryza sativa*) e continha um grupo hidroxila em

sua estrutura, foi convenientemente chamado de orizanol (GRAF, 1992). O óleo de arroz é naturalmente rico em antioxidantes, entre os quais, o γ -orizanol se destaca por sua associação com inúmeros efeitos fisiológicos positivos, sendo a maioria deles relacionados à prevenção de doenças cardiovasculares (JULIANO et al., 2005).

De acordo com Oliveira et al., (2007) e outros autores (JAYASHREE; SUBRAMANYAM, 2000; RASOOLI; ABYANEH, 2004), vem sendo demonstrado que os compostos antioxidantes podem atuar como antifúngicos e inibidores da produção de micotoxinas.

As estruturas químicas dos principais componentes do γ -orizanol estão apresentadas na Figura 3.

Figura 3. Estrutura química dos quatro componentes majoritários do γ -orizanol (em pontilhado a estrutura derivada do ácido ferúlico).

Estrutura Molecular	R	Nome do composto
		2,4-metileno cicloartenol ferulato
		cicloartenol ferulato
		β -sitosteril ferulato
		campesteril ferulato

Fonte: LERMA-GARCÍA et al., (2009).

A solubilidade do γ -orizanol em metil-etil-cetona é aproximadamente 20%. O γ -orizanol é praticamente insolúvel em água. A Tabela 4 apresenta a solubilidade do γ -orizanol em diversos solventes.

Tabela 4. Solubilidade do γ -orizanol.

Solvente	Solubilidade (20°C) (g/L)
Água	0,1
Etanol	1,3
Metanol	1,4
n-hexano	2,8
n-heptano	4
Benzeno	40
Acetona	67
Cloroformio	100
Metil-etil-acetona	200

Fonte: CALHEIROS, (2007).

As técnicas mais comuns para a determinação do γ -orizanol são a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a espectrofotometria ultravioleta (UV) (BUCCI et al., 2003). O método de CLAE é preciso e eficiente, porém apresenta como desvantagem o elevado custo da análise. A técnica de espectrofotometria, por outro lado, é simples, prática e barata, mas a desvantagem é que nem sempre os resultados obtidos são confiáveis, pois a leitura da absorvância pode sofrer forte interferência da matriz (componentes da amostra), levando a resultados equivocados, em geral, por superestimação (BUCCI et al., 2003). Em muitos trabalhos científicos a quantificação do γ -orizanol é feita por espectrofotometria UV, utilizando hexano, heptano ou éter de petróleo como solvente, com leitura da absorvância em comprimento de onda igual a 314, 315 ou 316 nm (BUCCI et al., 2003; DAS et al., 1998; YOSHIE et al., 2009; ZULLAIKAH et al., 2009). Entretanto, em estudo detalhado sobre comparação de métodos espectrofotométricos para determinação de γ -orizanol, Bucci et al., (2003) relatam que, para a técnica de espectrofotometria em comprimento de onda fixo, os resultados obtidos são mais precisos quando se utiliza álcool isopropílico como solvente de diluição das amostras. Neste caso a medição é feita a 327 nm, comprimento de onda no qual há menor interferência da matriz da amostra na leitura da absorvância.

3.3.2 Terpenos das sementes de nim

O gênero *Azadirachta* possui três espécies: *A. indica* A. Juss, *A. siamensis* Valeton e *A. excelsa* (Jack) Jacobs, todas pertencentes à família *Meliaceae*. No Brasil, a

espécie *Azadirachta indica* (nim) (Figura 4) foi introduzida em 1984 e, hoje se encontra em quase todas as regiões do País, pois este possui áreas com condições climáticas adequadas para o plantio do nim, principalmente nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste (MARTINEZ, 2002).

Figura 4. Árvore nim (*Azadirachta indica* A. Juss).



Extratos de nim são muito utilizados na agricultura orgânica, visto que são biodegradáveis e permanecem pouco tempo no solo (CARNEIRO, 2003).

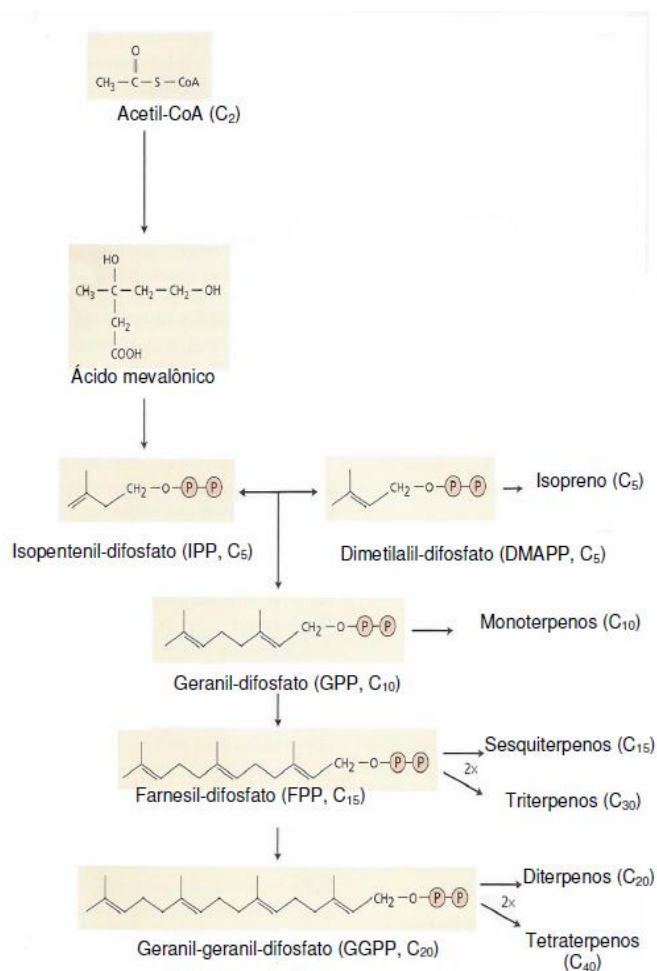
O nim possui vários metabólitos secundários sendo, na sua maioria, solúveis em água o que torna as extrações rápidas e de baixo custo. Todavia, a extração alcoólica permite obter maior quantidade de compostos em tempo menor. Para extração, as sementes devem estar bem secas para evitar a ativação de enzimas e posterior degradação do extrato (GUMIERO, 2008).

Mais de 300 compostos das sementes de nim foram caracterizados, sendo que a maioria são limonóides, classe de terpenos onde está a azadiractina, o mais importante presente nas sementes de nim (SILVA et al., 2007). Os limonóides são conhecidos como meliacinas, devido ao seu sabor amargo e por terem como principais fontes as espécies da família *Meliaceae* (VIEGAS JÚNIOR, 2003).

Os terpenos são formados, principalmente, pela via do mevalonato. O mevalonato (Figura 5) é formado pela condensação de uma unidade da acetoacetil-CoA com uma molécula da acetil-CoA. Após a condensação aldólica, ocorre uma hidrólise originando o 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA que é reduzido a mevalonato, numa reação irreversível. O mevalonato é, então, convertido em isopentenil-difosfato (IPP), ou isopreno ativo, a unidade básica na formação dos terpenos e esteróides. Uma isomerase catalisa a conversão do isopentenil-difosfato a seu isômero dimetilalil-difosfato (DMAPP), os dois reagem, formando o trans-geranil-difosfato que dará origem aos

monoterpenol. O geranyl-difosfato (GPP) condensa no sentido cabeça-cauda com o isopentenil-difosfato formando farnesil difosfato (FPP), resultando em sequiterpenóides (C15). Uma nova molécula de IPP reage com o farnesil-difosfato, originando o geranyl-geranyl-difosfato (GGPP) que será precursor dos diterpenos (C20). Finalmente, FPP e GGPP se dimerizam originando os triterpenos (C30) e os tetraterpenos (C40), respectivamente (TAIZ; ZEIGER, 2002).

Figura 5. Biossíntese de terpenos.



Fonte: TAIZ; ZEIGER, (2002).

Os compostos naturais de nim são obtidos por extração da planta e são biodegradáveis, portanto não deixam resíduos tóxicos nem contaminam o ambiente, além de possuírem ação repelente, reguladora de crescimento, acaricida, inseticida, fungicida e nematicida (MARTINEZ, 2003).

Estudos mostram a ação do óleo da semente de nim inibindo a motilidade dos parasitas por efeitos citotóxicos (KOUL; ISMAN, 1991) e a síntese de quitina, polímero

presente na parede celular dos fungos (SCHMUTTERER, 1990). O uso de extratos de folhas de nim mostrou inibição de certos patógenos foliares do arroz: *Pyricularia oryzae*, *Aspergillus niger* e *Fusarium moniliforme* (BHONDE et al., 1999).

3.4 Antioxidantes

Um antioxidante pode ser definido como uma substância que, em baixas concentrações, retarda ou previne a oxidação do substrato (HALLIWEL et al., 1995). Eles atuam por meio de dois principais mecanismos: o primeiro envolve a inibição da formação de radicais livres que possibilita a etapa de iniciação; o segundo abrange a eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, como alcoxila e peroxila, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (NAMIKI, 1990; SOARES, 2002; SIMIC; JAVANOVIC, 1994).

A oxidação é um processo essencial aos organismos aeróbios e ao nosso metabolismo, sendo os radicais livres produzidos naturalmente, como consequência desse processo de oxidação, ou por alguma disfunção biológica. Nestes radicais, o elétron desemparelhado encontra-se no átomo de oxigênio ou nitrogênio, sendo, portanto, estes radicais classificados como espécies reativas do oxigênio (ERO) ou espécies reativas do nitrogênio (ERN) (BARREIROS et al., 2006).

Os radicais livres possuem diferentes papéis no organismo e encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. Entretanto, seu excesso apresenta efeitos deletérios, tais como danos ao DNA, proteínas e organelas celulares, como mitocôndrias e membranas, provocando alterações na estrutura e funções celulares e, dessa forma, se encontram envolvidos em diversas patologias a exemplo de câncer, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, degenerativas e neurológicas, choque hemorrágico, catarata, disfunções cognitivas, etc (HALLIWELL, GUTTERIDGE; CROSS, 1992). Para combater os radicais livres, os organismos vivos produzem substâncias que são capazes de regenerar ou prevenir os danos oxidativos, exercendo seu papel como antioxidante. Além destes, substâncias com habilidade de sequestrar radicais livres podem ser obtidas de fontes externas, como no caso de animais a partir de alimentos e bebidas. Quando os antioxidantes endógenos são insuficientes para combater os radicais livres produzidos metabolicamente, este sofre ações degenerativas através do distúrbio conhecido como estresse oxidativo (ALVES et al., 2010).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos é principalmente devida às suas propriedades de óxido-redução, as quais podem desempenhar um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres, quelando o oxigênio triplete e singlete ou decompondo peróxidos (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKY, 2004).

Os compostos fenólicos são formados no metabolismo secundário dos vegetais e possuem funções de defesa contra o ataque de pragas. Em animais e humanos tem-se observado que são capazes de reagir com radicais livres, formando radicais estáveis. Esse poder de neutralização das estruturas radicalares dos compostos fenólicos é devido à sua estrutura química formada por pelo menos um anel aromático com grupamentos hidroxilas (GIADA; MANCINI-FILHO, 2006).

A partir do início dos anos 80, teve início o interesse em disponibilizar antioxidantes naturais para uso em produtos alimentícios ou farmacêuticos substituindo antioxidantes sintéticos. Estes últimos têm sido associados a danos de várias ordens incluindo o seu potencial carcinogênico e aumento do peso do fígado (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKY, 2004; MELO; GUERRA, 2002; YILDRIM et al., 2002). Os antioxidantes naturais, tais como os compostos fenólicos, apresentam-se como uma alternativa para prevenir a deterioração oxidativa dos alimentos e minimizar os danos oxidativos aos seres vivos quando ingeridos com a dieta (PESCHEL et al., 2006).

Dentre as fontes naturais que vêm sendo citadas pelo efeito funcional associadas à capacidade de prevenir processos oxidativos está o farelo de arroz (BIERHALS, 2009; OLIVEIRA; BADIALE-FURLONG, 2008). Outra fonte de compostos antioxidantes são as sementes de nim, obtidas de uma árvore, que pertence a família *Meliaceae*, e que conferem proteção aos lipídeos da membrana de mitocôndrias submetidas ao estresse oxidativo (CHAVES et al., 2013; PAVIANI, 2010; RIBEIRO, 2013). Os ácidos fenólicos, além de se apresentarem sob sua forma natural, podem também se ligar entre si ou com outros compostos (SOARES 2002). Um exemplo é o γ -orizanol, uma mistura de ésteres do ácido ferúlico com esterol ou alcóois triterpênicos. Esse composto é extraído do farelo de arroz e tem sua atividade antioxidante atribuída principalmente ao ácido ferúlico, que se apresenta esterificado com esteróis de plantas (CHIM et al., 2006; ZHIMIN, et al., 2001)

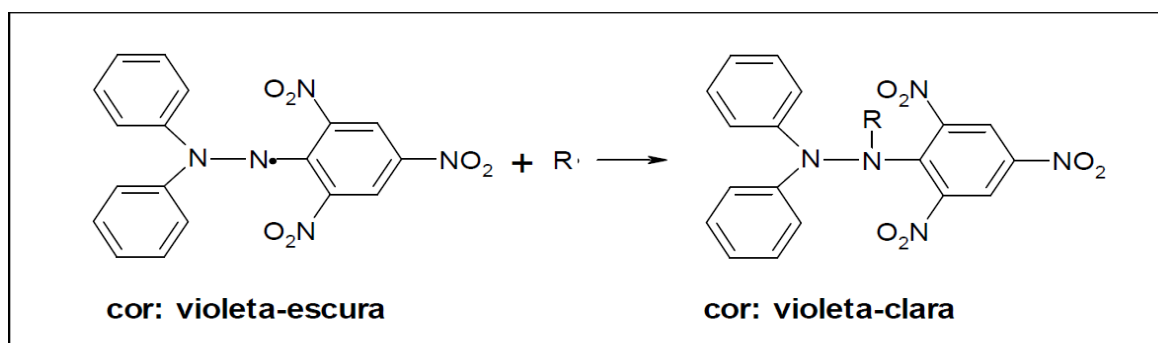
Devido aos diversos tipos de radicais e aos diferentes sítios de ação, dificilmente haverá um único método capaz de representar de forma segura e precisa a verdadeira atividade antioxidante de uma substância (SUCUPIRA et al., 2012). Por isso, é

importante utilizar mais de um método para prever a capacidade antioxidante de um composto.

3.4.1 Método do radical DPPH

Um dos métodos mais usados para verificar a capacidade antioxidante consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH[•]), de coloração púrpura, pelo antioxidante. O DPPH[•] é reduzido formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H), de coloração amarela (violeta clara) e é observado o decréscimo da absorvância (Figura 6) (HERRERO et al., 2005). A partir dos resultados obtidos é determinada a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH[•] remanescente no meio reacional (SOUSA et al., 2007). Esse método é considerado rápido, prático e com boa estabilidade (SUCUPIRA et al., 2012).

Figura 6. Estabilização do radical livre DPPH.



Fonte: RUFINO et al., (2007).

O sequestro de radicais livres é um dos mecanismos reconhecidos pelo qual ocorre a ação dos antioxidantes. O método de sequestro do radical livre DPPH pode ser utilizado para avaliar a atividade antioxidante de compostos específicos ou de um extrato em curto período de tempo (PRADO, 2009).

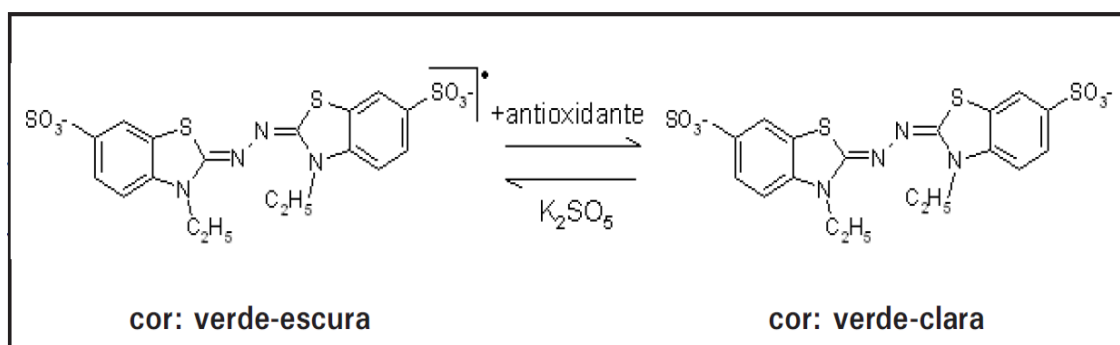
Este procedimento tem sido muito utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de frutas. O método apresenta vantagens quando os antioxidantes analisados são mais solúveis em solventes orgânicos, e por ser um radical livre estável está disponível comercialmente, o que evita sua geração por distintas formas (como ocorre com o método ABTS), além de facilitar seu uso (LIMA, 2008).

Na presença de um doador de hidrogênio ou elétron a intensidade de absorção diminui e a solução com o radical perde cor, tornando-se amarela, de acordo com o número de elétrons capturados, ou seja, quando o elétron desemparelhado do átomo de nitrogênio no DPPH recebe um átomo de hidrogênio proveniente de compostos antioxidantes, ocorre a mudança de cor (PRADO, 2009).

3.4.2 Método do radical ABTS

Um outro método usado para medir a atividade antioxidante é através da captura do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática (Figura 7). Com essa metodologia, pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI et al., 2004).

Figura 7. Estabilização do radical ABTS.^{•+} por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.



Fonte: RUFINO et al., (2007).

O radical ABTS^{•+} é produzido a partir de um precursor, o ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico. O radical ABTS^{•+} é um composto cromóforo quimicamente estável, apresenta alta solubilidade em água e um máximo de absorvância a 414 nm, e de medidas secundárias de absorvância a 645, 734 e 815 nm (MILLER et al., 1993).

O radical ABTS^{•+} deve ser gerado por reações enzimáticas ou químicas, podendo ser solubilizado em meios orgânicos e aquosos nos quais a atividade antioxidante pode ser determinada, dependendo da natureza dos compostos antioxidantes (ARNAO, 2000).

O método do ABTS (2,2-azino-bis(ethylbenzo-thiazoline- 6-sulfonic acid) diammonium salt) está baseado na habilidade dos antioxidantes em capturar o cátion $ABTS^{\bullet+}$. Esta captura provoca um decréscimo na absorvância (PEREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2006).

Este método apresenta vantagem em relação a outros, pois pode ser utilizado tanto para amostras hidrossolúveis quanto lipossolúveis (LIMA, 2008). Apresenta excelente estabilidade, sendo um dos testes mais rápidos de atividade antioxidante e que oferece resultados reprodutíveis. Ele tem sido utilizado em vários tipos de frutos como acerola, goiaba, camu-camu, açaí, maracujá, pitanga, entre outros (SUCUPIRA et al., 2012).

Métodos de geração do radical ABTS foram desenvolvidos, como a partir da oxidação do sal por persulfato de potássio, cuja reação ocorre na ausência de luz, por um período 12 a 16 horas. A energia de ativação requerida é baixa e a reação começa imediatamente. O ABTS reage estequiometricamente com o persulfato de potássio (HENRIQUEZ, ALIAGA; LISSI, 2002).

Esse método baseia-se na geração do $ABTS^{\bullet+}$, que apresenta cor azul esverdeado, por meio da reação do ABTS com persulfato de potássio. Com a adição de um antioxidante, ocorre a redução do $ABTS^{\bullet+}$ a ABTS promovendo a perda da coloração do meio reacional. Com a perda de cor, a porcentagem de inibição do $ABTS^{\bullet+}$ é determinada em função do Trolox, um padrão de antioxidante. O método é aplicável ao estudo de antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis, compostos puros e extratos vegetais (SUCUPIRA et al., 2012).

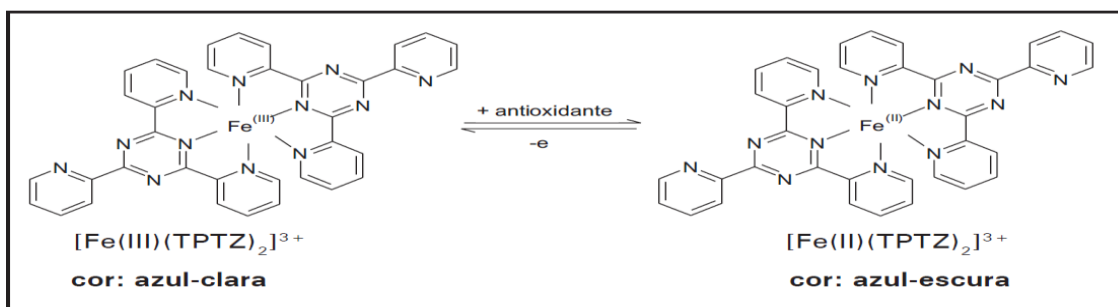
3.4.3 Método de redução do ferro (FRAP)

Esse método avalia a capacidade do antioxidante reduzir o metal Ferro III (sulfato férrico) à Ferro II (sulfato ferroso), formando um complexo de cor azul escuro (Figura 8). Neste método, o complexo férrico-tripiridiltriazina (Fe^{III} -TPZ) é reduzido ao complexo ferroso (Fe^{II} -TPZ) na presença de um antioxidante e em condições ácidas. O complexo formado por esta reação possui uma coloração azul intensa, com absorção máxima a 595 nm (BENZIE, 1996).

O ensaio do FRAP tem sido utilizado principalmente para determinação da capacidade antioxidante na fração polar de óleos vegetais ricos em compostos fenólicos, pois o reagente do ensaio do FRAP é incompatível com os solventes orgânicos utilizados para dissolver óleos ou sua fração apolar (PRIOR et al., 2005). Uma das

críticas aos métodos indiretos, como este, consiste no fato de que a capacidade de redução obtida não reflete necessariamente na atividade antioxidante da amostra (TIVERON, 2010).

Figura 8. Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe^{3+} .



Fonte: RUFINO et al., (2006).

3.4.4 Método da inibição da oxidação enzimática

A atividade antioxidante também pode se manifestar na inibição dos efeitos de oxidorredutases de escurecimento, particularmente com respeito à peroxidase, que é uma enzima que tem por função oxidar compostos doadores de elétrons, tais como os compostos fenólicos, tendo como agente doador de oxigênio a água oxigenada. Poucos estudos são realizados para avaliar o efeito inibidor de compostos fenólicos em sistemas enzimáticos, particularmente com respeito à peroxidase. Esta é uma enzima que aparece em células de diferentes seres vivos e tem como agente doador de oxigênio a água oxigenada (SOUZA, 2012).

Bioquimicamente, a função desta enzima é proteger as células de possíveis danos, e sua atividade se manifesta, principalmente, em situações de desequilíbrios físico-químicos do sistema. O excesso da ação desta enzima pode resultar em danos indesejáveis nas células. No caso dos alimentos, as principais alterações são perdas do flavor, da cor e dos nutrientes. A atuação da peroxidase sobre compostos doadores de elétrons a torna atrativa para se estimar a atividade antioxidante de diferentes compostos, como por exemplo, os fenóis (OLIVEIRA et al., 2007).

3.5 Cluster gênico da biossíntese de tricotecenos

A biossíntese de tricotecenos deriva de uma molécula precursora denominada tricodieno, um produto natural isolado pela primeira vez em 1948 de *Trichothecium roseum* Pers. (DESJARDINS et al., 1993). A sua síntese compreende uma sequência de

oxigenações, isomerizações, ciclizações e esterificações que levam a molécula básica tricodieno a formar complexas estruturas como diacetoxiscirpenol (DAS), toxina T-2, deoxinivalenol e nivalenol (DESJARDINS; PROCTOR, 2007; GOSWAMI; KISTLER, 2004). Esta rota metabólica requer a expressão de inúmeras enzimas, sendo que mais de 50% destas são expressas por um *cluster* gênico, o *cluster Tri* (ASTOLFI et al., 2010; KIMURA et al., 2003).

A caracterização molecular desse *cluster*, permite observar que a maioria dos genes codificantes desta via metabólica estão fortemente ligados ao *cluster Tri5* do genoma de *F. graminearum* (HOHN et al., 1995; KIMURA et al., 2007; LEE et al., 2002; MCCORMICK et al., 1996; MCCORMICK et al., 2004; WARD et al., 2002), onde genes das extremidades do mesmo estão envolvidos fortemente na biossíntese de quimiotipos específicos, codificando proteínas-chave na determinação dos quimiotipos. Por exemplo, a síntese da 15-O-acetil-transferase pelo gene *Tri3*, aparenta ser essencial para a determinação do quimiotipo 15ADON (MCCORMICK et al., 1996). Por outro lado, o gene *Tri13* codifica uma oxigenase que hidroxila o C-4, resultando na toxina nivalenol (LEE et al., 2002).

No tipo B de tricotecenos, o gene *Tri1* controla a adição dos grupos hidroxila no C-7 e C-8. Na etapa final da biossíntese é removido o grupo acetil do C-3 ou do C-15 por uma esterase codificada por *Tri8*. A atividade dessa esterase determina a produção de 3ADON ou 15ADON em *F. graminearum* (MCCORMICK et al., 1996).

3.6 Mecanismo dos compostos inibidores do crescimento fúngico

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 a quitina, o ergosterol e as manoproteínas, destruindo a membrana e afetando o controle da entrada de nutrientes. Ainda podem atuar inibindo a síntese de proteínas, aminoácidos fúngicos, esfingolipídios e interferir no transporte de elétrons, inviabilizando a integridade da célula (BRUL; KLIS, 1999; MARINO et al., 2001). Por exemplo, algumas ações específicas de antifúngicos ocasionam danos à 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). Os antifúngicos químicos exercem mecanismos similares, porém estes

tendem a produzir resíduos tóxicos e ainda ocasionar estresse mais intenso no metabolismo celular e desencadear os mecanismos de defesa da célula, resultando em compostos tóxicos (SOUZA, 2012).

Aos compostos fenólicos se atribui a capacidade de inibir a síntese de aminoácidos, atuando na rota do ácido chiquímico, resultando na impossibilidade do fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato produzirem ácido chiquímico, seguido da formação de triptofano ou ainda, impedir a produção de fenilalanina ou tirosina através da via do ácido prefênico (CASTRO et al., 2004). O efeito ocorre na inibição da catálise direto ou por impossibilitar a síntese da enzima por falta da síntese de aminoácidos importantes para a cadeia protéica (PAGNUSSATT, 2013).

A quantificação de genes chaves da biossíntese dos tricotecenos por PCR-RT pode ser uma importante ferramenta para conhecer o efeito dos antifúngicos na biossíntese dos tricotecenos e permitir melhores estratégias de controle a serem desenvolvidas durante o ciclo deste importante patógeno micotoxigênico em cereais (MARÍN et al., 2011).

A Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (PCR-RT) é capaz de monitorar o progresso da PCR enquanto ela progride, ou seja, em tempo real. Os dados são, desta forma, coletados ao longo da PCR, ao invés de serem apenas no final da reação. Isso revoluciona completamente o modo de abordagem da quantificação de DNA e RNA pela PCR. A PCR em tempo real utiliza o momento do ciclo da reação no qual a amplificação de um alvo é detectada pela primeira vez, ao invés da quantidade de alvo acumulado após um número fixo de ciclos. Quanto mais alto o número de cópias iniciais do ácido nucléico alvo, mais rápido será observado o aumento significativo na fluorescência (BEDRAN et al., 2010).

No Brasil existem poucos estudos que usam marcadores moleculares em especial com linhagens de *Fusarium* (ANGELOTTI et al., 2006; ASTOLFI et al., 2012; KURAMAE; SOUZA, 2002; ROCHA, 2010). Estudos prévios mostram relação direta entre conteúdo de DON e o gene de expressão *tri5* medido por RT-PCR (DOOHAN et al., 1999). Entretanto, não há estudos sobre este gene de expressão e sua relação com a aplicação de compostos antifúngicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC n° 7, de 18 de fevereiro de 2011. Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Seção 1, n. 37, ISSN 1677-7042, 2011.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. 2009. Reavaliação de Agrotóxicos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/020409.htm>>. Acesso em: abr. 2014.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria n°3/MS/SNVS, de 16 de janeiro de 1992.

AKIYAMA, H.; GODA, Y.; TANAKA, T.; TOYODA, M. Determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in spices using a multifunctional column clean-up. **Journal of Chromatograph A**, v. 932, p. 153-157, 2001.

ALVES FILHO, J. P. **Uso de agrotóxicos no Brasil controle social e interesses corporativos**. São Paulo: Annablume, 2002. 188 p.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ALVES, G. H.; FAGUNDES, G. A. M.; ELIAS, M. C.; RODRIGUES, M. R. A. Identificação dos ácidos graxos em farelos de arroz. In: **Anais XIX CIC, XII ENPOS, II Mostra científica**. Pelotas: UFPel, 2010.

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

ANGELOTTI, F.; TESSMANN, D. J.; ALVES, T. C. A.; VIDA, J. B.; FILHO, D. Z. J. HARAKAVA, R. Caracterização morfológica e identificação molecular de isolados de *Fusarium graminearum* associados à giberela do trigo e triticale no sul do Brasil. **Summa Phytopathology**, v. 32, n. 2, p. 177-179, 2006.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science and Technology**, v. 11, n. 11, p. 419-421, 2000.

ASTOLFI, P.; REYNOSO, M. M.; RAMIREZ, M. L.; CHULZE, S. N.; ALVES, T. C. A.; TESSMANN, D. J.; DEL PONTE, E. M. Genetic population structure and

trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat in southern Brazil. **Plant Pathology**, v. 61, n. 2; p. 289-295, 2012.

ASTOLFI, P.; SANTOS, J.; SPOLTI, P.; TESSMANN, D. J.; PONTE, E. M. D. Complexo *Fusarium graminearum*: taxonomia, potencial toxigênico e genética populacional na era molecular. **Revista Anual de Patologia de Plantas**, v. 18, p. 78-119, 2010.

BADIALE-FURLONG E. Tricotecenos. In: **Atualidades em micotoxinas e armazenamento de grãos**. Florianópolis: Vildes M. Scussel, 2000.

BAPTISTA, A. S.; HORIL, J.; BAPTISTA, A. S. fatores físico-químicos e biológicos ligados à produção de micotoxinas. **Boletim do centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 22, n. 1, p. 1-14, 2004.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M., DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BECKER-ALGERI, T. A.; HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; HACKBART, H. C. S.; BADIALE-FURLONG, E. Thermal treatments and their effects on the fumonisin B1 level in rice. **Food Control**, v. 34, p. 488-493, 2013.

BEDRAN, T. B. L.; NOGUEIRA, M. N. M.; SPOLIDORIO, L. C.; ESTRELA, C.; SPOLIDORIO, D. M. P. Patógenos Periodontais: Comparação entre Cultura Bacteriana e PCR em Tempo Real para Teste Diagnóstico. **Revista Odontológica do Brasil Central**, v. 19, n. 50, 2010.

BENZIE, I. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 47, p. 233-261 1996.

BHONDE, S. B.; DESHPANDE, S. G.; SHARMA, R. N. In vitro evaluation on inhibitory nature of some Neem formulations against plant pathogenic fungi. **Hindustan Antibiot Bulletin**. v. 41, p. 22-24, 1999.

BIERHALS, V. S.; MACHADO, V. G.; ECHEVENGUÁ, W. O.; COSTA, J. A. V.; FURLONG, E. B. Compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e antifúngica de multimisturas enriquecidas com a microalga *Spirulina platensis*. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 1, p. 42-48, 2009.

BOK, J. W.; KELLER, N. P.; LAE, A. A regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. **Eukaryotic Cell**, v. 3, p. 527-535, 2004.

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

BUCCI, R. et al. Comparison of three spectrophotometric methods for the determination of γ -oryzanol in rice bran oil. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.375, n.8, p. 1254-1259, 2003.

CALHEIROS, M. N. **Extração de orizanol da borra de neutralização do óleo de farelo de arroz**. 2007. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2007.

CARNEIRO, S. M. T. P. G. Efeito de extratos de folhas e óleo de nim sobre o oídio do tometeiro. **Summa Phytopathologia**. v. 29, n. 1, p. 262-265, 2003.

CERVERÓ, M. C.; CASTILLO, M. A.; MONTES, R.; HERNANDEZ, E. Determination of trichothecenes, zearalenone and zearalenols in commercially available corn-based foods in Spain. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 24, p. 52-55, 2007.

CHAVES, M. B. S. C.; MARCONDES, L. H. Q.; PIVA, P. A.; KONRATH, I.; T.; GRAÇAS, S. B.; GERRERO, A. T. G.; GUILHERMINO, J. F.; YANO, M. Determinação dos teores de fenóis totais, quinonas e atividade antioxidante do noni (*Morindacitrifolia*) e do nim indiano. **Revista de Biotecnologia e Ciência**, v. 1, n. 2, 2013.

CHIM, J. F.; ZAMBIAZI, R. C.; LEITÃO, A. M. Farelo de arroz: capacidade antioxidante de frações ricas em orizanol. **Boletim do centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 279-288, 2006.

COMMISSION REGULATION n° 856/2005 of 6 June 2005. Amending Regulation (EC) no 466/2001 as regards *Fusarium* toxins. **Official Journal of the European Union**, v. 143, n. 3, 2005.

COSTA, F. L. F. **Resíduos de agrotóxicos em alimentos: implicações para saúde pública e meio ambiente**. 2010. 20 f. Dissertação (Mestre em Biociências Forenses) - Universidade Católica de Goiás, Goiás, 2010.

COUTINHO, W. M.; PEREIRA, L. A. A.; MACHADO, J. C.; MAGALHAES, F. H. L.; PENA, R. C. M. P.; VIEIRA, M. G. G. C. Qualidade fisiológica de sementes de arroz em função da ocorrência diferenciada de *Drechslera oryzae*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n. 1, p. 124-129, 2000.

CROFT, K.D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 854, p. 435-442, 1998.

D'MELLO, J. P. F.; PLACINTA, C. M.; MACDONALD, A. M. C. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health: welfare and productivity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 80, p. 183-205, 1999.

DALLAGNOL, L. J.; NAVARINI, L.; BALARDIN, R. S.; GOSENHEIMER, A.; MAFFINI A. A. Dano das doenças foliares na cultura do arroz irrigado e eficiência de controle dos fungicidas. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 12, p. 313-318, 2006.

DAS, P. K.; CHAUDHURI, A.; KAIMAL, T.N.B.; BHALERAO, U.T. Isolation of γ -oryzanol through calcium ion induced precipitation of anionic micellar aggregates. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 3073-3080, 1998.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DOOHAN F. M.; WESTON, G.; REZANOOR, H. N.; PARRY, D. W.; NICHOLSON, P. Development and use of a reverse transcription-PCR assay to study expression of *Tri5* by *Fusarium* species *in vitro* and in plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3850-3854, 1999.

DORS, G. C. **Uso de fungicida no cultivo do arroz irrigado e seus efeitos na composição físico-química, bioquímica e micotoxicológica dos derivados do grão**. 2010. 170 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2010.

ECOBICHON, D. J. Toxic effects of pesticides. In: AMDUR, M. O.; DOULL, J.; KLAASSEN, C. D. **Casarett and Doll's toxicology: the basic science of poisons**. 4. ed. New York: Mc Graw Hill, 1993.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrigadoBrasil/cap14.htm>>. Acesso em: abr. 2014.

ERIKSEN, G. S.; ALEXANDER, J. ***Fusarium* toxins in cereals – a risk assessment**. Copenhagen: TemaNord, 1998.

EZEKIEL, C. N.; WARTH, B.; OGARA, I. M.; ABIA, W. A.; EZEKIEL, V. C.; ATEHNKENG, J.; SULYOK, M.; TURNER, P. C.; TAYO, G. O.; KRSKA, R.; BANDYOPADHYAY, R. Mycotoxin exposure in rural residents in northern Nigeria: a pilot study using multi-urinary biomarkers. **Environment International**, v. 66, p. 138–145, 2014.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2009. **Limites máximos de Resíduos**. Disponível em: <http://fao.org/faostat/pestdes/pest_ref/pest-e.htm#E9E1> Acesso em: abr. 2014.

FARIA, L. J. S.; **Avaliação de diferentes solventes na extração em fase sólida de pesticidas em água. Desenvolvimento e validação de metodologia**. 2004. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2004.

FERGUSON, L.R., HARRIS, P.J. Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 8, n. 1, p. 17-25, 1999.

FERNANDES, F. C. Micotoxinas: Risco Biológico para trabalhadores em Aviários. **Revista Brasileira de Medicina do Trabalho**. v. 2, p. 200-208, 2004.

FERNANDEZ, M. A.; SAENZ, M. T.; GARCIA, M. D. Antiinflammatory activity in rats and mice of phenolic acids isolated from *Scrophularia frutescens*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 50, n. 10, p. 1183-1186, 1998.

FILHO, F. C. C.; CALVET, R. M.; ROSA, C. A. R.; PEREIRA, M. M. G.; COSTA, A. P. R.; MURATORI, M. C. S. Monitoramento de fungos toxigênicos e aflatoxinas em rações utilizadas em piscicultura. **Ciência Animal Brasileira.**, v. 14, n. 3, p. 305-311, 2013.

FONSECA, H. **Micotoxinas on line**. 2004. Disponível em: <www.micotoxinas.com.br>. Acesso em: abril. 2014.

FURLANI, R. P. Z.; OLIVEIRA, P. L. C.; SOARES, L. M. V. Avaliação de métodos para determinação de ocratoxina A em cafés verdes e torrados. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, n. 2, p. 87-98, 1999.

GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Otimização de metodologia para derivação de deoxinivalenol através de planejamento experimental. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 270-274, 2008.

GAUMY, J. L.; BAILLY, J. D.; BERNARD, G.; GUERRE, P. Zearalenone: origin and effects on farm animals. **Revista Medicina Veterinária**, v. 1152, p. 123-136, 2001.

GIADA, M. L. R.; MANCINI FILHO, J. Importância dos compostos fenólicos da dieta na promoção da saúde humana. **Publicatio UEPG Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 12, n. 4, p. 7-15, 2006.

GILBERT, J. Quality assurance in mycotoxin analysis. **Food Additives and Contaminants**, v. 10, n. 1, 1999.

GONÇALEZ, E.; PINTO, M. M.; FELICIO, J. D. Análise de micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999. **O Biológico**, v. 63, n. 1/2, p. 15-19, 2001.

GOSWAMI, R. S.; KISTLER, H. C. Pathogenicity and in planta mycotoxin accumulation among members of the *Fusarium graminearum* species complex on wheat and rice. **Phytopathology**, v. 35, n. 12, p. 95:1397-404. 2005.

GRAF, E.; Antioxidant Potential of ferulic acid. **Free Radical Biology e Medicine**, v. 13, p. 345-448, 1992.

GUMIERO, V. C. **Estudo do efeito de hipersensibilidade do extrato de nom (*Azadirachta indica*) sobre cultura de células de *Rubus fruticosus***. 2008. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2008.

HALLIWEL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; AROUMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 601-617.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M.; CROSS, C. E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 119, p. 598-620, 1992.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; HACKBART H. C. S.; SOUZA, M. M.; DORS, G.; FAGUNDES, C. A.; BADIALE-FURLONG, E. Determinação de deoxinivalenol e zearalenona em arroz natural e parboilizado e suas frações utilizando QuEChERS e HPLC/UV-FL. **Química Nova**, v. 35, n. 6, 2012.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; MENDES, G. L.; SCAGLIONI, P. T.; BADIALE-FURLONG E. SOUZA-SOARES, L. A. Biochemistry and metabolism of mycotoxins: A review. **African Journal of Food Science**, v. 5, n. 16, p. 861-869, 2011.

HENRIQUEZ C, ALIAGA C, LISSI E. Formation and decay of the ABTS derived radical cation: A comparison of different preparation procedures. **International Journal of Chemical Kinetics**, v. 34, n. 12, p. 659-665, 2002.

HERRERO, M., MARTÍN-ÁLVAREZ, P., SEÑORÁNS, F.J., CIFUENTES, A., IBÁÑEZ, E. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. **Food Chemistry**, v. 93, p.417-423, 2005.

HOLLINGER K.; EKPERIGIN H. E. Mycotoxins in food producing animals. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 15, p. 133-165, 1999.

HÝSEK, J.; VÁŇOVÁ, M.; HAJŠLOVÁ, J.; BROŽOVÁ, J.; SYCHROVÁ, E.; RADOVÁ-SYPECKÁ, Z.; ŠÍP V.; SÝKOROVÁ, S.; CHRPOVÁ, J.; TVARŮŽEK, L. Variation in the production of trichothecene mycotoxin deoxynivalenol (DON) in spring barley varieties after treatment with the fungicides azoxystrobin and tebuconazole. **Plant Protection Science**, v. 41, n. 2, p. 58–62, 2005.

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

JULIANO, C.; COSSU, M.; ALAMANNI, M. C.; PIU, L. Antioxidant activity of gamma-oryzanol: Mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oils. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 299, p. 146–154, 2005.

KLIX, M. B.; BEYER, M.; VERREET, J. A. 2008. Effects of cultivar, agronomic practices, geographic location, and meteorological conditions on the composition of selected *Fusarium* species on wheat heads. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 30, p. 46-57.

KOUL, O.; ISMAN, M., B. Effects of azadirachtin on the dietary utilization and development of the Variegated Cutworm *Peridroma saucia*. **Journal of Insect Physiology**, v. 37, p. 591-598, 1991.

KURAMAE, E. E.; SOUZA, N. L. Variabilidade genética entre formaes especiais de *Fusarium oxysporum* e raças 1 e 2 de *F. oxysporum* f. sp. lycopersici através de RAPD e sequências de regiões ITS e rDNA. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 5, 1481-1485. 2002.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; GARCÍA-PARILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M.; FETT, R. Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 691-693, 2004.

LEAL, P. C.; CANTANHEDE, K. L.; SILVA, L. M.; BAZERRA, G. F. B.; VIANA, G. M. C.; NASCIMENTO, M. D. S. B. Micotoxinas do *Fusarium* e seu potencial carcinogênico. **Revista Newslab**, v. 70, 2005.

LEHOTAY, S.J., *et al.* Validation of a Fast and Easy Method for the determination of Residues from 229 Pesticides in Fruits and Vegetables Using Gas and

Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection. **Journal of AOAC International**, v. 88, p. 412-431, 2005.

LERMA-GARCÍA, M.J.; HERRERO-MARTÍNEZ, J.M.; SIMÓ-ALFONSO, E.F.; MENDONÇA, C.R.B.; RAMIS-RAMOS, G. Composition, industrial processing and applications of rice bran γ -oryzanol. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 389-404, 2009.

LESLIE, J. F.; ZELLER, K. A.; SUMMERELL, B. A. Icebergs and species in populations of *Fusarium*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 59, n. 3, p. 107-117, 2001.

LESLIE, J. F.; BOWDEN, R. L. 2008. *Fusarium graminearum*: when species concepts collide. **Cereal Research Communications**, v. 36, p. 609-615, 2008.

LIMA A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*caryocar brasiliense*, camb.).** 2008. 181 f. Tese (Doutorado em Bromatologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MAPA, (2011) – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/mercado-interno/agrotoxicos>> Acesso em: abr. 2014.

MARÍN, P.; JURADO, M.; MAGAN, N.; VÁZQUEZ, C.; GONZÁLEZ-JAÉN, M. T. Effect of solute stress and temperature on growth rate and Tri5 gene expression using real time RT-PCR in *Fusarium graminearum* from Spanish wheat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, p. 169–174, 2010.

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

MAROCHI, M. A.; SOARES, L. M. V.; FURLANI, R. P. Z. Testes confirmatórios para tricotecenos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 56, p. 17-20, 1996.

MARTINEZ, S. O **nim *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção.** Londrina: IAPAR, 2002.

MARTINEZ, S. S. O uso do Nim no café e em outras culturas. **Revista Agroecologia Hoje**. n. 4, p. 13-14, 2003.

MARTINEZ-ROMERO, D.; GUILLÉN, F.; VALVERDE, J. M.; BAILÉN, G.; ZAPATA, P.; SERRANO, M.; CASTILLO, S.; VALERO, D. Influence of carvacol on

survival of *Botrytis cinerea* inoculated in table grapes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 144-148, 2008.

MCCORMICK, S. P.; HOHN, T. M.; DESJARDINS, A. E. Isolation and characterization of *Tri3*, a gene encoding 15-O-Acetyltransferase from *Fusarium sporotrichioides*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 62, n. 2, p. 353-359, 1996.

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance, **Euphytica**, v. 124, p. 163-180, 2002.

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

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.

MILLER N. J.; RICE-EVANS, C. A.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v. 84, n. 4, 407-412, 1993.

MIROCHA, C. J.; PATHRE, S. Identification of the toxic principle in a sample of poaeufusarin. **Applied Microbiology**, v. 26, p. 719-724, 1973.

MOREIRA, J. C.; JACOB, S. C.; PERES, F.; LIMA, J. S. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola em Nova Friburgo-RJ. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 7, p. 1-22, 2002.

MOSS, O. M. Secondary metabolism and food intoxication-moulds. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**, v. 73, p. 80S-88S, 1992.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Journal of Nutrition**, v. 29, n. 4, p. 273-300, 1990.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: The MacMillan Press, 1979.

OLIVEIRA, M. S.; BADIALE-FURLONG, E. Screening of antifungal and antimycotoxigenic activity of plant phenolic extracts. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, n. 2, p. 1-10, 2008.

OLIVEIRA, M. S.; DORS, G. C.; SOUZA-SOARES, L. A.; BADIALE-FURLONG, E. Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, n. 3, p. 267-275, 2007.

PAGNUSSATT, F. A.; KUPSKI, L.; DARLEY, F. T.; FILODA, P. F.; PONTE, E. M.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. *Fusarium graminearum* growth inhibition mechanism using phenolic compounds from *Spirulina* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, p. 75-80, 2013.

PAGNUSSATT, F. A.; DEL PONTE, E. M.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and mycotoxin production by phenolic extract from *Spirulina* sp. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 108, p. 21-26, 2014.

PALMA M.; LIAZID A.; BRIGUI J.; BARROSO C. G. Investigation on Ochratoxin A stability using different extraction techniques. **Talanta**, v. 71, p. 976-980, 2007.

PARK, J. W.; CHOI, S. Y.; HWANG, H. J.; KIM, Y. B. Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished rice destined for humans. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, p. 305– 314, 2005.

PAVIANI, V. **Efeito do extrato de *Azadirachta indica* (nim) sobre resposta de hipersensibilidade mediada por ácido salicílico em células de *Rubus fruticosus***. 2010. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

PEREIRA, A. V. S. **Sensibilidade a fungicidas e adaptabilidade de *Lasiodiplodia theobromae* patogênico ao mamão**. 2009. 57 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, 2009.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, p. 791-800, 2006.

PESCHEL, W.; SÁNCHEZ-RABANEDA, F.; DIEKMANN, W. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. **Food Chemistry**, v. 97, n.1, p. 137-150, 2006.

POPPI, R. J.; BRAGA, J. W.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIN, I. C. S. F.; GOICOECHEA, H. C.; OLIVIERI, A. C. Determination of pesticides and metabolites in wine by high performance liquid chromatography and second-order calibration methods. **Journal of Chromatography A**, v. 1148, p. 200-210, 2007.

PRADO A. **Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais**. 2009. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS – um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v.32, p.1620-1634, 2009.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290-4302, 2005.

RASOOLI, I.; ABYANEH, M. R. Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Food Control**, v. 15, n. 6, p. 479-483, 2004.

REIS, A.; RIBEIRO, F. H. S.; MIZUBUTI, E. S. G. Caracterização de isolados de *Phytophthora infestans* do Distrito Federal e de Goiás. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 270-276. 2006.

RIBEIRO, P. C. **Propriedades biológicas do óleo das sementes de *Azadirachta indica*: investigação dos mecanismos de ação antioxidante e dos seus efeitos sobre a viabilidade celular**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do ABC, São Paulo, 2013.

ROCHA, L. O. **Distribuição de fungos e micotoxinas em grãos de milho recém-colhidos e variabilidade genética das cepas de *Fusarium verticillioides* e *Aspergillus flavus* isoladas**. 2010. 174 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). **Comunicado técnico on line da Embrapa**, n. 125, 2006.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado técnico on line da Embrapa**. n. 127, 2007.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS⁺. **Comunicado técnico on line da Embrapa**, n. 128, 2007.

SALEM, N. M.; AHMAD, R. Mycotoxins in food from Jordan: Preliminary survey. **Food Control**, n. 21, p. 1099–1103, 2010.

SANTIN, E.; MAIORKA, A.; ZANELLA, I.; MAGON, L. Micotoxinas do *Fusarium* spp na avicultura comercial. **Ciência Rural**, v.31, n.1, p.185-190, 2000.

SCHNEIDER, E. P. **Contaminação química e microbiológica na cadeia produtiva do pêssego: contribuição à análise de risco**. 2012. 109 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, 2012.

SHIER, W. T. Estrogenic mycotoxins. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 149, p. 599-604, 1998.

SIFOU, A.; MECA, G.; SERRANO, A. B.; MAHNINE, N.; EL ABIDI, A.; MAÑES, J.; EL AZZOUZI, M.; ZINEDINE, A. First report on the presence of emerging *Fusarium* mycotoxins enniatins (A, A1, B, B1), beauvericin and fusaproliferin in rice on the Moroccan retail markets. **Food Control**, v. 22, p. 1826-1830, 2011.

SILVA, J. C. T.; JHAM, G. N.; OLIVEIRA, R. D. L.; BROWN, L. Purification of the seven tetranortriterpenoids in neem (*Azadirachta indica*) seed by counter-current chromatography sequentially followed by isocratic preparative reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 1152, n. 1, p. 203-210, 2007.

SIMIC, M. G., JAVANOVIC, S. V. Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. *In*: HO, C.T., OSAWA, T., HUANG, T.M., ROSEN, R.T. **Food phytochemicals for cancer prevention**. Washington: American Chemical Society, 1994.

SMITH, J. E.; HENDERSON, S. Mycotoxins and Animal Foods. **Boca Ratón: CRC Press**, p. 31-35, 1991.

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

SOUZA, M. V. **Resíduos de agrotóxicos ditiocarbamatos e organofosforados em alimentos consumidos no restaurante universitário da UnB: avaliação da exposição humana**. 2006. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.;

BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais, **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351- 355, 2007.

SOUZA, M. M.; PRIETTO, L.; RIBEIRO, A. C.; SOUZA, T. D.; BADIALE-FURLONG, E. Assessment of the antifungal activity of *Spirulina platensis* phenolic extract against *Aspergillus flavus*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1050-1058, 2011.

SOUZA, M. M. **Potencial antifúngico, antioxidante e inibidor da síntese de aflatoxinas dos extratos fenólicos de *Chlorella sp.* e *Spirulina platensis***. 2012. 163 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2012.

SOUZA, M. M.; ROCHA, M.; OLIVEIRA, M. S.; BADIALE-FURLONG, E. Avaliação das atividades antifúngica e antimicotoxina de extratos fenólicos de farelo de arroz. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 437-441, 2012.

STROKA, J.; OTTERDIJK, R. V.; ANKLAM, E. Immunoaffinity column clean-up prior to thin-layer chromatography for the determination of aflatoxins in various food matrices. **Journal of Chromatograph A**, v. 904, p. 251-256, 2000.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **Revista Uopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263-269, 2012.

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. W.; SHEPHARD, G. S. Chromatographic and allied methods of analysis for selected mycotoxins. In: GILBERT, J. **Progress in Food Contaminants Analysis**. London: Blackie Academic and Professional, 1996.

SYDENHAM, E.; THIEL, P. G. Physicochemical data from some selected *Fusarium* toxins. **Journal of AOAC International**, v. 79, n. 6, p. 1365-1379, 1996.

SYNDER, A. P. Qualitative and technological aspects of the trichothecene mycotoxins. **Journal of Food Protection**. v. 49, n. 7, p. 544-569, 1986.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3. ed. Sunderland: Sinauer, 2002, 690p.

TANAKA, T. Analysis of Mycotoxins. Textbook for country focused training course: mycotoxins analysis for federative republic of Brazil. **Hyogo International Centre Japan International Cooperation Agency**, 2001.

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

TAVELLA, L. B.; SILVA, I. N.; FONTES, L. O.; DIAS, J. R. M.; SILVA, M. I. L. O uso de agrotóxicos na agricultura e suas consequências toxicológicas e ambientais. **ACSA - Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 7, n. 2, p. 6-12, 2011.

TAYLOR, J. W.; JACOBSON, D. J.; KROKEN, S.; KASUGA, T.; GEISER, D. M.; HIBBETT, D. S.; FISHER, M. C. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal Genetics Biology**, v. 31, n. 1, p. 21-32, 2000.

TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. 2010. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAMB, S.; PILETSKY, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, p.168–180, 2009.

VELLUTI, 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**, v. 89, p. 145– 154, 2003.

VIEGAS JUNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**. v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

YILDRIN, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 49, p. 4083-4089, 2001.

YOSHIE, A. et al. Comparison of γ -oryzanol contents in crude rice bran oils from different sources by various determination methods. **Journal of Oleo Science**, v. 58, n. 10, p. 511–518, 2009.

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

ZULLAIKAH, S.; MELWITA, E.; JU, Y. H. Isolation of oryzanol from crude rice bran oil. **Bioresource Technology**, v. 100, p.299–302, 2009.

CAPÍTULO III

ARTIGO 1

EXTRAÇÃO DE γ -ORIZANOL DE FARELO DE ARROZ

RESUMO

O γ -orizanol, um fitoquímico, tem atividade antioxidante e benefícios potenciais para saúde. Esse estudo objetivou desenvolver um método para extração de alta quantidade de γ -orizanol de farelo de arroz e verificar sua estabilidade em diferentes solventes. Dentre os cinco métodos estudados, o que teve maior rendimento em γ -orizanol foi melhorado, usando um delineamento composto central rotacional (DCCR - 2^4 , incluindo 8 experimentos no ponto axial e 4 no ponto central, totalizando 28 experimentos). As variáveis testadas foram temperatura, tempo, volume e proporção de hexano:isopropanol usados na extração. Elevado conteúdo de γ -orizanol ($13,98 \text{ mg g}^{-1}$) foi obtido quando as condições de extração foram 40°C , 40 min e 75 mL de hexano:isopropanol (1:3). Os limites de detecção e quantificação do método foram $0,9 \mu\text{g g}^{-1}$ e $3,1 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. A precisão instrumental foi 0,004%, a repetibilidade (CV_r) 9,4% e a recuperação $111,7 \pm 17,7\%$. γ -orizanol é mais estável em isopropanol do que em hexano, onde 100% da concentração foi mantida após refrigeração por 72 dias.

Palavras-chave: antioxidante, espectrofotômetro, estabilidade, fitoquímico.

1 INTRODUÇÃO

Os antioxidantes protegem os tecidos animais de radicais livres e previnem doenças degenerativas e envelhecimento. O farelo de arroz contém altos níveis de vários fitoquímicos que têm atividade antioxidante, bem como outras propriedades benéficas à saúde. Fitoquímicos, tais como a vitamina E, tocoferóis (Ts), tocotrienóis (T3S) e γ -orizanol têm ganhado atenção em vários estudos (CHOTIMAKORN et al., 2008; LOPES et al., 2012).

γ -orizanol é composto principalmente de ésteres do ácido trans-ferúlico (ácido trans-hidroxicinâmico) e fitoesteróis (esteróis e álcoois triterpênicos), como cicloartenol, β -sitosterol, 24-metilenocycloartenol e campesterol (XU; GODBER, 2000; LERMA-GARCIA et al., 2009).

Os métodos relatados para a extração de γ -orizanol incluem extração líquido-líquido, em fase sólida, com fluido supercrítico e extração direta com solvente (XU; GODBER, 2000), a qual tem sido a mais utilizada, uma vez que não requer instrumentação específica. Esses quatro métodos envolvem repetidas extrações do óleo do farelo de arroz (RBO), geralmente com hexano. Sob condições ótimas de extração, no entanto, os solventes mais polares, hexano:isopropanol (1:1, v/v) extraem mais γ -

orizanol do farelo de arroz do que hexano em uma temperatura elevada, embora hexano recupere mais RBO (HU et al., 1996; XU; GODBER, 2000; SAENJUM et al., 2012).

As técnicas mais comuns para determinar γ -orizanol são cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e espectrometria de ultravioleta (UV) (ROGERS et al., 1993). Apesar da técnica HPLC ser precisa e eficiente, o elevado custo envolvido na análise é uma desvantagem. A técnica de espectrofotometria, por outro lado, é simples, prática e de baixo custo, mas os resultados nem sempre são precisos porque a leitura da absorvância pode ser fortemente influenciada pela matriz (componentes da amostra) (BUCCI et al., 2003).

Neste estudo, o objetivo foi obter um método de extração de γ -orizanol a partir de farelo de arroz usando parâmetros de validação (especificidade, linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão instrumental, repetibilidade e recuperação) e verificar a sua estabilidade em diferentes solventes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Padrão, reagentes e amostras

O padrão de γ -orizanol foi adquirido da Wako Chemicals, EUA (pureza > 98%). Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram analiticamente puros. O farelo de arroz foi cedido por indústria de arroz do estado do Rio Grande do Sul, Brasil e foi congelado (-18°C) até o uso.

2.2 Testes preliminares

Inicialmente, 5 métodos de extração de γ -orizanol foram testados. O que proporcionou maior rendimento em γ -orizanol foi melhorado usando o *Central Composite Rotable Design* (CCRD). Os métodos em estudo diferiam principalmente na massa da amostra, solvente, tempo e temperatura utilizada para a extração de γ -orizanol e a separação de impurezas (Tabela 1).

Tabela 1. Métodos de extração avaliados para extração de γ -orizanol.

Método	Massa de amostra (g)	Tempo (min)	Solvente usado na extração	Temperatura de extração (°C)
1	50	180	Hexano	69
2	20	60	Hexano:isopropanol (1:3)	40
3	20	60	Clorofórmio:metanol (3:2)	Ambiente
4	1	1	Hexano	Ambiente
5	10	30	Hexano:isopropanol (1:1)	60

1: Zullaikah et al. (2009); 2: Zigoneanu et al. (2008); 3: Azrina et al. (2008); 4: Lilitchan et al. (2008); 5: Xu; Godber (2000). Temperatura ambiente = $25 \pm 5^\circ \text{C}$.

2.3 Planejamento experimental para estudo das condições de extração do γ -orizanol

O CCRD (2^4 com pontos axiais e centrais) com 4 replicas no ponto central, totalizando 28 experimentos, foi usado para as 4 variáveis selecionadas do planejamento fatorial; o conteúdo de γ -orizanol foi a resposta. Os experimentos foram realizados de acordo com o método descrito por Xu e Godber, (2000). A Tabela 2 mostra os valores codificados e reais para os níveis do planejamento.

Tabela 2. Valores dos níveis codificados e reais usados no CCRD.

Fatores	-2	-1	0	1	2
Temperatura (°C)	30	40	50	60	70
Tempo (min)	10	20	30	40	50
Volume de hexano:isopropanol (mL)	15	35	55	75	95
Proporção de hexano:isopropanol	0,5:3,5	1:3	1:1	3:1	3,5:0,5

2.4 Extração de γ -orizanol usada no CCRD

O farelo de arroz (10 g) foi suspenso em água destilada (50 mL) seguido pela adição de ácido ascórbico (2 g). A mistura foi levada ao vórtex por 2 minutos e incubada a temperatura e tempo mostrados na Tabela 2. Diferentes volumes de hexano:isopropanol (Tabela 2) foram adicionados, seguido de 30 s de vórtex e centrifugação a $3220 \times g$ por 15 min. A fase orgânica foi separada em funil de separação. O resíduo foi extraído novamente com hexano:isopropanol (10 mL) e o processo repetido. As fases orgânicas combinadas foram evaporadas em evaporador rotatório a 70°C (XU; GOLDBER, 2000).

2.5 Quantificação de γ -orizanol

O composto foi dissolvido em isopropanol e a absorbância lida a 326 nm usando espectrofotômetro (VARIAN CARY/100 UV-VISIVEL) (LILITCHAN et al., 2008).

2.6 Análise dos dados

A análise estatística foi realizada usando Statistica 7.0 a um nível de confiança de 95%, considerando o conteúdo de γ -orizanol ($\text{mg}_{\gamma\text{-orizanol}} \text{g}_{\text{amostra}}^{-1}$) como resposta das variáveis em estudo.

2.7 Parâmetros de validação

A validação foi baseada na *International Conference on Harmonisation* (ICH, 1995) e na Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, anexo da RE no. 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003).

A especificidade foi determinada com o γ -orizanol extraído do farelo de arroz e com o γ -orizanol padrão, em hexano ($11 \mu\text{g mL}^{-1}$) e isopropanol ($9 \mu\text{g mL}^{-1}$), para verificar possíveis interferentes (BRASIL, 2003). O espectro de absorbância foi determinado na faixa de 270-400 nm formando um espectro gráfico.

O padrão de γ -orizanol (3, 5, 8, 10, 13, 15, 18, 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi diluído em hexano e isopropanol foi utilizado para construção de duas curvas de calibração (em triplicata) para avaliar a linearidade.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados considerando o desvio do padrão dividido pela inclinação, obtido a partir de regressão linear. As

equações 1 e 2 foram utilizados para determinar os limites de detecção e de quantificação, respectivamente (BRASIL, 2003):

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC} \quad (2)$$

Em que DPa é o desvio padrão do intercepto do eixo y da curva padrão, e IC é a inclinação da curva padrão.

A precisão instrumental foi avaliada por 10 medidas sucessivas de uma solução padrão de γ -orizanol em isopropanol ($9 \mu\text{g mL}^{-1}$). A precisão do método de extração foi avaliada em termos de repetibilidade (CV_r) após fortificação do farelo de arroz em três níveis, cada um em triplicata: 1,5; 5 e $10 \mu\text{g g}^{-1}$ (RIBANI et al., 2004). Os resultados foram expressos em termos de coeficiente de variação ($CV\%$) (ICH, 1995).

A exatidão foi avaliada pelas mesmas amostras utilizadas no estudo da precisão e calculada de acordo com a Equação 3:

$$R(\%) = \frac{\text{quantidade medida} - \text{branco}}{\text{quantidade adicionada}} \cdot 100 \quad (3)$$

2.8 Estabilidade do γ -orizanol em hexano e isopropanol

Padrão de γ -orizanol foi dissolvido em hexano e isopropanol e mantido em 3 temperaturas diferentes, sendo elas: temperatura ambiente ($25 \pm 5^\circ\text{C}$), temperatura de congelamento ($-18 \pm 2^\circ\text{C}$) e de refrigeração ($10 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 72 dias para determinar a sua estabilidade. γ -orizanol foi quantificado diariamente durante 14 dias, seguido pela medida semanal por um mês e, depois, pela medida mensal.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

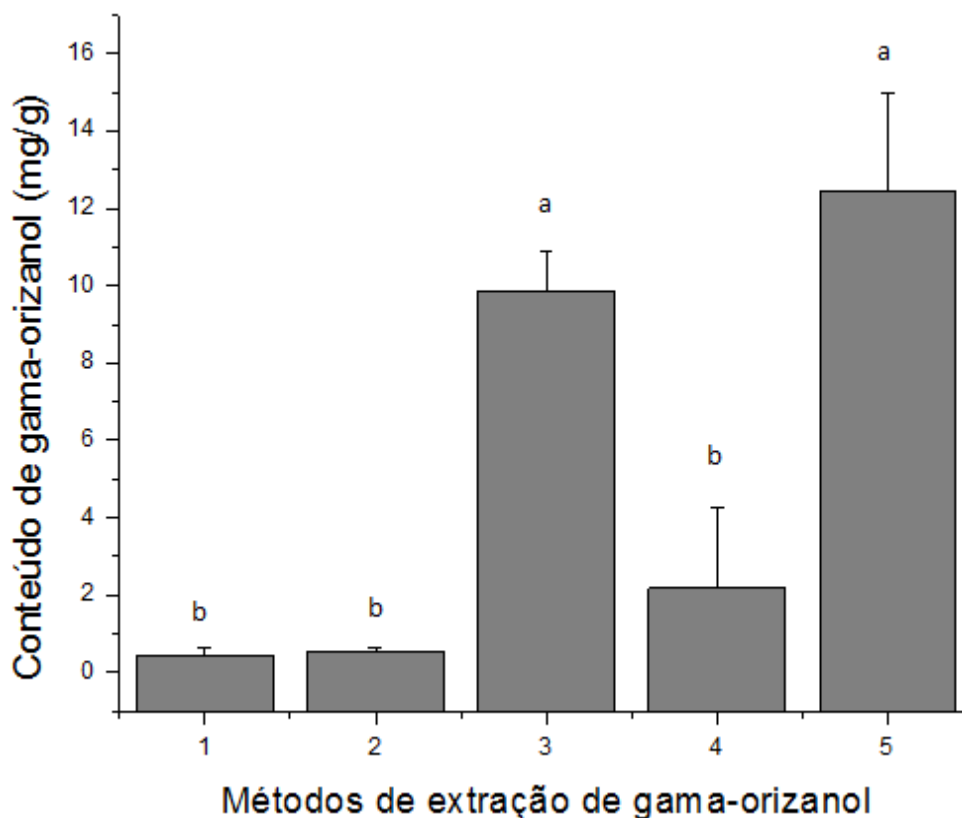
3.1 Testes preliminares

O maior teor de γ -orizanol ($12,4 \text{ mg g}^{-1} \pm 2,0$) foi obtido a partir do método 5 (Tabela 1 e Figura 1) e, por isso, foi submetido a um CCRD para melhorar o

rendimento.

Figura 1. Métodos de extração de γ -orizanol e seus rendimentos (n = 3).

(1): Zullaikah et al. (2009); (2): Zigoneanu et al. (2008); (3): Azrina et al. (2008); (4): Lilitchan et al. (2008); (5): Xu; Godber (2000).



Valores demonstrados como média \pm erro padrão (n=3). Letras diferentes indicam que há diferença significativa (Tukey HSD, $p < 0,05$).

3.2 Delineamento experimental para estudar as condições de extração do γ -orizanol

Os resultados de γ -orizanol (mg g^{-1}) do CCRD para as 4 variáveis em estudo (temperatura, tempo, volume e proporção de hexano:isopropanol) estão mostrados na Tabela 3.

Neste planejamento, o rendimento de γ -orizanol variou de 1,50 a 13,98 mg g^{-1} . Os melhores valores foram encontrados no experimento 5, 6, 7, 8 e 22 sendo que todos eles mostraram altos volumes de solventes, no nível +1 (75 mL) ou +2 (95 mL), e proporção de hexano:isopropanol no nível -1 (1:3) ou 0 (1:1).

Tabela 3. Valores codificados e reais e a resposta do conteúdo de γ -orizanol.

	Temperatura (°C)	Tempo (min)	VOLUME de hexano:isopropanol (mL)	Proporção de hexane:isopropanol (mL)	γ - orizanol (mg g ⁻¹)
1	-1 (40)	-1 (20)	-1 (35)	-1 (1:3)	2,32
2	+1 (60)	-1 (20)	-1 (35)	-1 (1:3)	2,94
3	-1 (40)	+1 (40)	-1 (35)	-1 (1:3)	5,09
4	+1 (60)	+1 (40)	-1 (35)	-1 (1:3)	6,23
5	-1 (40)	-1 (20)	+1 (75)	-1 (1:3)	11,10
6	+1 (60)	-1 (20)	+1 (75)	-1 (1:3)	12,37
7	-1 (40)	+1 (40)	+1 (75)	-1 (1:3)	13,98
8	+1 (60)	+1 (40)	+1 (75)	-1 (1:3)	13,93
9	-1 (40)	-1 (20)	-1 (35)	+1 (3:1)	1,78
10	+1 (60)	-1 (20)	-1 (35)	+1 (3:1)	2,75
11	-1 (40)	+1 (40)	-1 (35)	+1 (3:1)	1,94
12	+1 (60)	+1 (40)	-1 (35)	+1 (3:1)	1,75
13	-1 (40)	-1 (20)	+1 (75)	+1 (3:1)	2,32
14	+1 (60)	-1 (20)	+1 (75)	+1 (3:1)	1,50
15	-1 (40)	+1 (40)	+1 (75)	+1 (3:1)	2,69
16	+1 (60)	+1 (40)	+1 (75)	+1 (3:1)	4,06
17	-2 (30)	0 (30)	0 (55)	0 (1:1)	9,68
18	+2 (70)	0 (30)	0 (55)	0 (1:1)	7,01
19	0 (50)	-2 (10)	0 (55)	0 (1:1)	6,55
20	0 (50)	+2 (50)	0 (55)	0 (1:1)	7,42
21	0 (50)	0 (30)	-2 (15)	0 (1:1)	2,63
22	0 (50)	0 (30)	+2 (95)	0 (1:1)	11,12
23	0 (50)	0 (30)	0 (55)	-2 (0,5:3,5)	4,31
24	0 (50)	0 (30)	0 (55)	+2 (3,5:0,5)	2,48
25	0 (50)	0 (30)	0 (55)	0 (1:1)	8,09
26	0 (50)	0 (30)	0 (55)	0 (1:1)	8,95
27	0 (50)	0 (30)	0 (55)	0 (1:1)	9,18
28	0 (50)	0 (30)	0 (55)	0 (1:1)	6,30

Uma estimativa dos efeitos principais foi obtida pela avaliação da diferença de desempenho do processo causado por uma mudança de um nível mais baixo (-1) para um nível mais elevado (+1) (HAALAND, 1989). A medida do desempenho do processo foi o conteúdo de γ -orizanol. O valor de p foi usado para verificar a significância dos fatores em estudo (Tabela 4).

Tabela 4. Principais efeitos e análise de interação para o conteúdo de γ -orizanol.

Fator	Efeito (mg.g ⁻¹)	Erro padrão	t -Valor	p -Valor
Média	8,13	0,24	26,67	0,000 ^a
T (°C) (L)	-0,08	0,53	-0,16	0,883
t (min) (L)	1,19	0,53	2,24	0,111
V solv. (mL) (L)	4,51	0,53	8,46	0,003 ^a
Proporção de solv. (L)	-4,40	0,53	-8,25	0,004 ^a

^a fator significativo $p < 0,05$.

O volume do solvente (Tabela 4) foi encontrado como sendo a variável mais relevante para na extração de γ -orizanol. O conteúdo de γ -orizanol aumentou em uma média de 4,51 mg g⁻¹ com o aumento do volume de hexano:isopropanol de 35 para 75 mL. A alteração na proporção de hexano:isopropanol de 1:3 para 3:1 levou a uma diminuição média no γ -orizanol extraído de 4,40 mg g⁻¹.

O efeito combinado do volume e proporção de hexano:isopropanol resultou numa redução média de 4,05 mg g⁻¹ no γ -orizanol extraído. A temperatura e tempo, bem como outras combinações não tiveram efeito significativo.

A análise de variância (ANOVA) foi usada para avaliar a adequabilidade do modelo para construção do modelo de segunda ordem para prever o conteúdo de γ -orizanol (variável dependente) como uma função do volume e proporção de hexano:isopropanol (variável independente).

A ANOVA foi usada para verificar se existia diferença significativa. No presente estudo, a ANOVA foi determinada usando o teste estatístico de *Fisher*. O F -valor foi obtido pela razão do quadrado médio da regressão pelo resíduo (FRANCIS et al 2003).

Um modelo de segunda ordem foi estabelecido (Equação 4) baseado na ANOVA (Tabela 5), o qual descreve o conteúdo do γ -orizanol como uma função das variáveis independentes. O fator erro foi baixo, indicando a boa precisão dos dados. Baseado no teste F, o modelo foi preditivo, uma vez que o F calculado foi maior que o tabelado e o coeficiente de regressão foi perto de uma unidade (0,81). O modelo foi usado para gerar o diagrama de contorno (Figura 2).

Tabela 5. ANOVA para o conteúdo de γ -orizanol para CCRD.

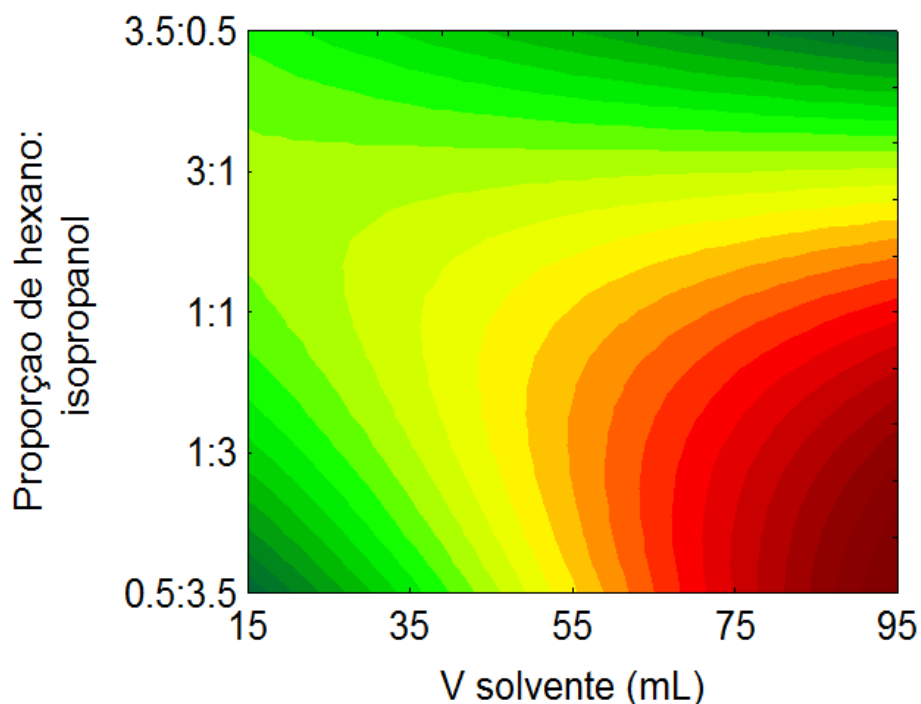
Variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F-valor
Resíduo	79,00	23	3,43	24,92 ^a
Regressão	341,98	4	85,49	
Falta de ajuste	73,89	20		
Erro puro	5,12	3		
Total	420,99	27		

Coeficiente de regressão = 0,81; $F_{0,95; 4; 23} = 2,80$; ^a F-valor (regressão/resíduo).

A Figura 2 mostra o efeito da proporção e volume de hexano:isopropanol no conteúdo de γ -orizanol. A concentração do γ -orizanol foi encontrada como sendo entre 11,10 - 13,98 mg/g (Tabela 3) extraído com elevado volume de solvente e baixa proporção de hexano:isopropanol.

Elevado conteúdo de γ -orizanol (13,98 mg/g) pode ser obtido pela extração nas condições do experimento 7: 40°C, 40 min, 75 mL de hexano:isopropanol (1:3).

Figura 2. Diagrama de contorno do conteúdo de γ -orizanol como função da proporção e volume de hexano:isopropanol.

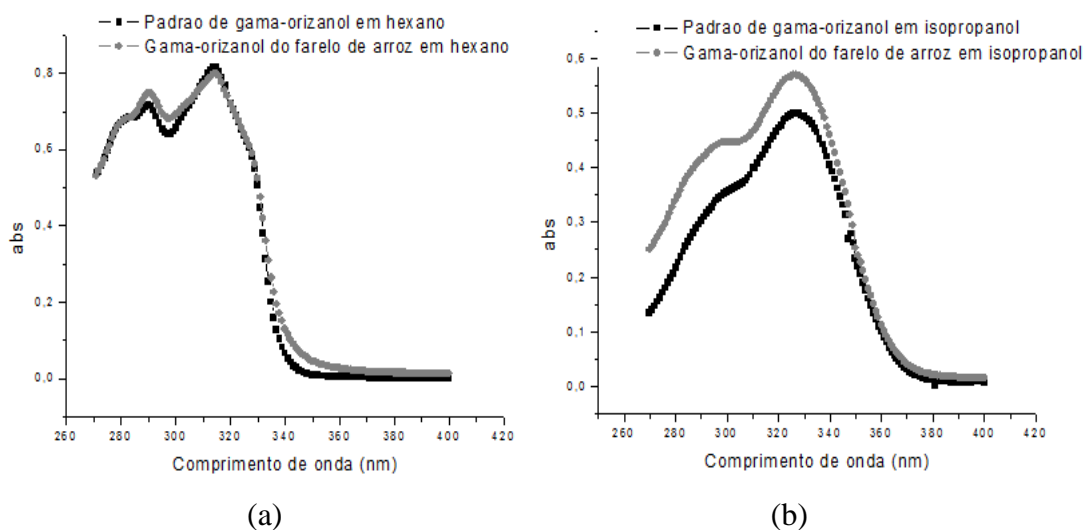


$$\gamma\text{-orizanol} = 7,097 + 2,256 \cdot x - 2,200 \cdot y - 1,175 \cdot y^2 - 2,027 \cdot x \cdot y \quad (4)$$

3.3 Parâmetros de validação

A Figura 3 mostra o espectro obtido (270-400 nm) para o γ -orizanol padrão ($11,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e para o extrato ($9,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), ambos dissolvidos em hexano e isopropanol; a absorção máxima foi observada a 314 nm e 326 nm, respectivamente. Assim, esses comprimentos de onda foram considerados para quantificação de γ -orizanol espectrofotometricamente. O fator matriz para o composto dissolvido em hexano foi 0,99 e em isopropanol foi 1,14. De acordo com Krueve et al., (2009), não há efeito matriz quando essa resposta é igual a 1, demonstrando que o método de extração não tem efeito de matriz; Isso implica que a quantificação do composto sobre a condição estabelecida é possível.

Figura 3. Espectro de absorção do γ -orizanol em hexano (a) e isopropanol (b).



A máxima absorção (λ_{\max}) do γ -orizanol variou nos diferentes solventes dependendo de suas polaridades. As curvas de calibração do γ -orizanol nos máximos comprimentos de onda (λ_{\max}) foram $y = 71,4 x$ ($R^2=0,9991$; $\lambda_{\max} = 314$ nm) para hexano e $y = 56,6 x$ ($R^2 = 0,9991$; $\lambda_{\max} = 326$ nm) para isopropanol, onde y é a absorbância e x a concentração (mg/mL). A faixa de concentração das curvas de calibração foram 3-20 $\mu\text{g/mL}$ para todos os solventes usados.

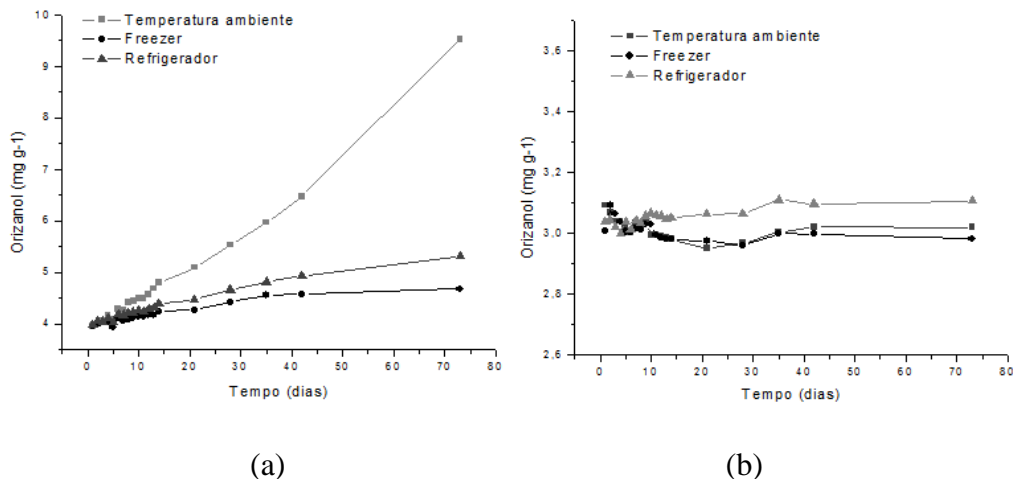
O LD e o método de extração foram $0,946 \mu\text{g g}^{-1}$ e o LQ foi $3,15 \mu\text{g g}^{-1}$. A precisão instrumental foi 0,004% e a repetibilidade (CV_r) foi 9,4%.

A recuperação foi avaliada usando as condições de experimento 7 (40°C , 40 min, 75 mL de hexano:isopropanol 1:3) e $111,7 \pm 17,7\%$ de recuperação foi obtida.

3.4 Estabilidade do γ -orizanol em hexano e isopropanol

γ -orizanol foi mais estável em isopropanol do que em hexano, onde manteve 100% da concentração em temperatura de refrigeração por 72 dias (Figura 4).

Figura 4. Concentração de γ -orizanol ($\mu\text{g g}^{-1}$) em hexano (a) e isopropanol (b) armazenado em diferentes temperaturas: ambiente ($25 \pm 5^\circ\text{C}$), freezer ($-18 \pm 2^\circ\text{C}$) e refrigeração ($10 \pm 2^\circ\text{C}$) por 72 dias.



A Figura 4 mostra que o hexano não foi apropriado para quantificação e armazenamento do γ -orizanol porque o solvente evaporou e, conseqüentemente, concentrou o analito. Por outro lado, o isopropanol foi apropriado para quantificação e armazenamento do γ -orizanol com elevada estabilidade (98% em temperatura ambiente; 99% em temperatura de freezer e 100% em temperatura de refrigeração) por 72 dias.

Solventes com elevada volatilidade (como hexano) podem ser perdidos durante a transferência, afetando o volume do solvente e a concentração do soluto. Então, solventes com moderada ou baixa volatilidade, como isopropanol ou di-n-butil éter podem ter vantagens, especialmente em elevada temperatura ambiente (HU, et al., 1996), como é demonstrado na Figura 4.

4 CONCLUSÃO

Um método de extração de γ -orizanol preciso e exato foi estabelecido usando baixa temperatura e solvente com baixa toxicidade. Um elevado conteúdo de γ -orizanol ($13,98\text{mg g}^{-1}$) pode ser obtido usando as seguintes condições de extração: 40°C , 40 min e 75 mL de hexano:isopropanol (1:3). γ -orizanol foi mais estável em isopropanol do que em hexano, onde manteve 100% da concentração em temperatura de refrigeração após 72 dias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZRINA, A.; MAZNAH, I.; AZIZAH, A.H. Extraction and determination of oryzanol in rice bran of mixed herbarium UKMB; AZ 6807: MR 185, AZ 6808: MR 211, AZ 6809: MR 29. **ASEAN Food Journal**, v. 15, n. 1, p. 89-96, 2008.

BRASIL, Resolução RE n° 899, de 29 de maio de 2003, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa; Publica o “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”, Diário Oficial da União, Brasília (DF), de 02 de junho de 2003.

BUCCI, R.; MAGRÌ, A. D.; MAGRÌ, A. L.; MARINI, F. Comparison of three spectrophotometric methods for the determination of γ -oryzanol in rice bran oil. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 375, n. 8, p. 1254–1259, 2003.

CHOTIMAKORN, C.; BENJAKUL, S.; SILALAI, N. Antioxidant components and properties of five long-grained rice bran extracts from commercial available cultivars in Thailand. **Food Chemistry**, v. 111, n. 3, p. 636-641, 2008.

FRANCIS, F.; SABU, A.; NAMPOOTHIRI, K. M.; RAMACHANDRAN, S.; GHOSH, S.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 15, n. 2, p. 107–115, 2003.

HAALAND, P.D. **Experimental design in biotechnology**. New York : Marcel Dekker, 1989.

HU, W.; WELLS, J. H.; SHIN, T. S.; GODBER, J. S. Comparison of isopropanol and hexane for extraction of vitamin E and oryzanol from stabilized rice bran. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 73, n. 2, p. 1653-1656, 1996.

ICH. International Conference on Harmonisation. **Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology**, 1995. Disponível em:<<http://www.pharma.gally.ch/ich/q2a038195en.pdf>>. Acesso em: 25 jun. 2012.

KRUVE, A.; LEITO, I.; HERODES, K. Combating matrix effects in LC/ESI/MS: The extrapolative dilution approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 651, n. 1, p. 75–80, 2009.

LERMA-GARCÍA, M. J.; HERRERO-MARTÍNEZ, J. M.; SIMÓ-ALFONSO, E. F.; MENDONÇA, C. R. B.; RAMIS-RAMOS, G. Composition, industrial processing and applications of rice bran γ -oryzanol. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 389-404, 2009.

LILITCHAN, S.; TANGPRAWAT, C.; ARYUSUK, K.; KRISNANGKURA, S.; CHOKMONH, S.; KRISNANGKURA, K. Partial extraction method for the rapid analysis of total lipids and γ -oryzanol contents in rice bran. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 752-759, 2008.

LOPES, M. M. A.; MIRANDA, M. R. A.; MOURA, C. F. H.; FILHO, J. E. Bioactive compounds and total antioxidant capacity of cashew apples (*Anacardium occidentale* L.) during the ripening of early dwarf cashew clones. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, n. 3, p. 325-332, 2012.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. J.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, Campinas, v.27, n.5, p.771-780, set./out., 2004.

ROGERS, E. J.; RICE, S. S. M.; NICOLOSI, R. J.; CARPENTER, D. R.; MCCLELLAND, C. A.; ROMANCZYK, L. J. Identification and quantification of γ -oryzanol components and simultaneous assessment of tocopherols in rice bran oil. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 70, n. 3, p. 301-307, 1993.

SAENJUM, C.; CHAIYASUT, C.; CHANSAKAOW, S.; SUTTAJIT, M.; SIRITHUNYALUG, B. Antioxidant and anti-inflammatory activities of gamma-oryzanol rich extracts from thai purple rice bran. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 6, p.1070-1077, 2012.

XU, Z.; GODBER, S. Comparison of supercritical fluid and solvent extraction methods in extracting γ -oryzanol from rice bran. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 77, n. 5, p. 547-551, 2000.

ZIGONEANU, I. G.; WILLIAMS, L.; XU, Z.; SABLIOV, C. M. Determination of antioxidant components in rice bran oil extracted by microwave-assisted method. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 4910-4918, 2008.

ZULLAIKAH, S.; MELWITA, E.; JU, Y. H. Isolation of oryzanol from crude rice bran oil. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 299-302, 2009.

ARTIGO 2

CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FITOQUÍMICOS DE FARELO DE ARROZ E SEMENTES DE NIM

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo caracterizar fitoquímicos presentes no farelo de arroz (γ -orizanol e ácidos fenólicos) e nas sementes de nim (ácidos fenólicos) bem como verificar a capacidade antioxidante deles. O farelo de arroz e as sementes de nim foram caracterizados quanto a composição centesimal, pH e acidez. Do farelo de arroz, foram extraídos o γ -orizanol e os ácidos fenólicos (EFF). Das sementes de nim foram extraídos os ácidos fenólicos (EFN), totalizando três extratos naturais. Para caracterização do γ -orizanol, seus ácidos graxos foram identificados em GC-FID e seus componentes majoritários em HPLC-UV. Para a caracterização dos fenóis, os ácidos fenólicos do farelo de arroz e das sementes de nim foram determinados em HPLC-UV. A capacidade antioxidante dos extratos foi verificada pelo consumo do radical livre DPPH \cdot , capacidade de captura do radical ABTS \cdot^{+} , redução do ferro e inibição da oxidação enzimática. A maior parte dos ácidos graxos do γ -orizanol foi insaturado (84%). Os componentes majoritários do γ -orizanol (cicloartenol ferulato, 2,4-metileno cicloartanol ferulato, campesteril ferulato, β -sitosteril ferulato) estão presentes na amostra e no padrão, confirmando a presença do γ -orizanol no extrato. Foram identificados e quantificados cinco ácidos fenólicos presentes nos extratos de farelo de arroz e sementes de nim, sendo o ácido gálico majoritário em ambos extratos. A quantidade de extrato necessário para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (CE₅₀) foi: 28,9 μ g/mL para γ -orizanol; 2,1 μ g/mL para EFF e 14,2 μ g/mL para EFN. O extrato fenólico do farelo de arroz apresentou atividade antioxidante destacada em relação aos demais extratos naturais estudados.

Palavras-chave: γ -orizanol, farelo de arroz, sementes de nim.

1 INTRODUÇÃO

Um antioxidante pode ser definido como uma substância que, em baixas concentrações, retarda ou previne a oxidação de outro composto num mesmo sistema (HALLIWEL et al., 1995). Eles atuam por meio de dois principais mecanismos: o primeiro envolve a inibição da formação de radicais livres que possibilitam a etapa de iniciação; o segundo abrange a eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, como alcoxila e peroxila, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (NAMIKI, 1990; SIMIC; JAVANOVIC, 1994; SOARES, 2002).

Os antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais (SHAHIDI et al., 1992), agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários,

formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias (NAWAR, 1985). Os compostos fenólicos e alguns de seus derivados são, portanto, eficazes para prevenir processos oxidativos (SHAHIDI et al., 1992; SOARES, 2002).

Dentre as fontes naturais que vêm sendo citadas pelo efeito funcional associadas à capacidade de prevenir processos oxidativos está o farelo de arroz (BIERHALS, 2009; OLIVEIRA; BADIALE-FURLONG, 2008). Esta propriedade do farelo se deve a presença dos ácidos fenólicos, que além de se apresentarem na forma livre, podem também se ligar entre si ou com outros compostos (SOARES, 2002). Um exemplo é o γ -orizanol, extraído do farelo de arroz, constituído por uma mistura de ésteres do ácido ferúlico com esterol ou alcóois triterpênicos (CHIM et al., 2006; HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2012) cuja atividade antioxidante é atribuída principalmente ao ácido ferúlico, que se apresenta esterificado com esteróis de plantas (CHIM et al., 2006; ZHIMIN et al., 2001).

Outra fonte de compostos antioxidantes são as sementes de nim, obtidas de uma árvore, que pertence a família *Meliaceae*, e que conferem proteção aos lipídeos da membrana de mitocôndrias submetidas ao estresse oxidativo (CHAVES et al., 2013; PAVIANI, 2010; RIBEIRO, 2013).

Devido aos diversos tipos de radicais e aos diferentes sítios de ação, dificilmente haverá um único método capaz de representar de forma segura e precisa a verdadeira atividade antioxidante de uma substância (SUCUPIRA, et al., 2012). Por isso, é importante utilizar mais de um método para prever a capacidade antioxidante de um composto.

O interesse em estudar o efeito antioxidante de extratos naturais neste trabalho está no fato de que a peroxidação lipídica e a contaminação microbiana são as duas principais causas da deterioração de alimentos durante seu processamento e armazenamento e elas podem ser inibidas ou evitadas com os antioxidantes (CAO et al., 2009). Além disso, estudos têm demonstrado que antioxidantes podem atuar na inibição de fungos e micotoxinas (FARNOCHI et al., 2005; FERROCHIO et al., 2013; TORRES et al., 2003).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar fitoquímicos presentes no farelo de arroz (γ -orizanol e ácidos fenólicos) e nas sementes de nim (ácidos fenólicos) bem como verificar a capacidade antioxidante deles.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização físico-química das matérias-primas (farelo de arroz e sementes de nim)

O farelo de arroz, usado para extração do γ -orizanol e compostos fenólicos, foi cedido por empresa da região de Pelotas-RS e armazenado a -18°C . O mesmo foi peneirado até granulometria de 35 mesh. As sementes de nim, usadas para extração de compostos fenólicos, foram cedidas pela empresa Base Fértil Agrícola Ltda, localizada em Cravinhos-SP e armazenadas em temperatura de 4°C . As mesmas foram moídas e peneiradas até gramulometria de 24 mesh.

Ambos foram caracterizados através da determinação dos teores de umidade, cinzas, proteínas (fator de conversão 5,7), lipídios e pH e acidez pelos procedimentos da AOAC, (2000). A determinação de fibras foi realizada utilizando-se método químico, determinando o resíduo orgânico insolúvel da amostra, após digestão ácida e alcalina (BRASIL, 1991). Os percentuais de carboidratos foram estimados por diferença.

A caracterização geométrica das sementes de nim foi feita pela medida do comprimento, largura e espessura de 50 amêndoas antes da moagem.

2.2 Extração de γ -orizanol do farelo de arroz

γ -orizanol foi extraído de acordo com Heidtmann-Bemvenuti et al., (2012), utilizando-se 10 g de farelo de arroz, que foi suspenso em 50 mL de água destilada. O ácido ascórbico (2 g) foi adicionado à mistura antes da agitação em vórtex por 2 min e incubação a 40°C durante 40 min. Setenta e cinco mililitros de hexano: isopropanol (1:3) foram adicionados, utilizou-se vórtex por 30 s, e após, o conteúdo foi centrifugado a $1320 \times g$ durante 15 min. A camada orgânica foi separada em funil de separação. O resíduo da centrifuga foi misturado com 10 mL de hexano: isopropanol e centrifugado novamente. A camada orgânica foi combinada com a anterior e evaporada em vácuo a 70°C . A medição da absorção foi tomada em um espectrofotômetro UV-Vis (modelo Cary 100-Varian) a 326 nm de comprimento de onda por dissolução em isopropanol.

2.3 Caracterização do γ -orizanol

2.3.1 Perfil de ácidos graxos

Para a identificação dos ácidos graxos, o óleo contendo γ -orizanol passou pelo processo de esterificação para obtenção dos metil ésteres dos ácidos graxos (METCALFE, SCHMITZ; PELKA, 1966). A separação de ácidos graxos foi realizada em Cromatógrafo a gás Varian 3400CX, equipado com detector de ionização de chama e coluna ZB-WAX, com 30 m de comprimento e 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de filme. O gás de arraste foi hidrogênio a 0,5 mL min^{-1} . As temperaturas do injetor e do detector foram 250 e 300°C, respectivamente. A temperatura inicial da coluna foi 40°C aumentando 6°C/min até 100°C permanecendo 1 min, após a 160°C permanecendo 5 min e a 230°C permanecendo 10 min. Os ácidos graxos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção com padrões (Supelco® 37 Component FAME Mix) e quantificados por normalização de áreas. O percentual de cada ácido graxo foi obtido pela Equação 1.

$$\text{Ácido graxo (\%)} = \frac{\text{média da área do pico do ácido graxo}}{\sum \text{das áreas de todos ácidos graxos}} \cdot 100 \quad (1)$$

2.3.2 Perfil dos componentes majoritários do γ -orizanol

A confirmação dos componentes majoritários do γ -orizanol foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector ultravioleta (HPLC-UV) utilizando-se o padrão do γ -orizanol (150 $\mu\text{g/mL}$) e o extrato do farelo de arroz (40 $\mu\text{g/mL}$) nas mesmas condições de Paucar-Menacho et al., (2007).

A eluição dos componentes da mistura foi realizada com acetonitrila:metanol:isopropanol 50:45:5 (v/v/v) com fluxo de 1,0 mL min^{-1} , comprimento de onda de 315 nm, volume do *loop* de 20 μL e usando como fase estacionária a coluna Hypersil ODS (5 μm) 250 x 4,6 mm (PAUCAR-MENACHO et al., 2007).

Os quatro picos majoritários correspondem, respectivamente, ao cicliartenil ferulato, 2,4-metileno cicloartenil ferulato, campesteril ferulato e β -sitosteril ferulato.

A linearidade foi avaliada pela construção de curva analítica através de padronização externa com solução padrão de γ -orizanol nas concentrações: 30, 50, 80, 110 e 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Cada solução foi preparada em triplicata a partir de uma solução trabalho 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os dados de regressão linear foram obtidos com auxílio do

software do equipamento. O padrão de γ -orizanol foi adquirido da Wako Chemicals, USA (grau de pureza = 98%).

2.4 Extração dos compostos fenólicos do farelo de arroz e de sementes de nim

A extração dos compostos fenólicos do farelo de arroz e das sementes de nim foi realizada a frio utilizando-se álcool metílico na proporção de 1:8 de massa:solvente, em agitador horizontal a 200 rpm durante 120 min em temperatura ambiente. A agitação foi interrompida por 15 min e reiniciada após adição de 10 mL de metanol. Em seguida foi realizada partição com hexano, clarificação com hidróxido de bário 0,1 M e sulfato de zinco 5%. O conteúdo fenólico foi determinado por método espectrofotométrico utilizando o reagente Folin Ciocalteau e os resultados foram expressos em equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de amostra. A curva padrão de ácido gálico foi construída entre as concentrações 2 a 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e leitura a 750 nm (FURLONG et al., 2003; SOUZA et al., 2011).

2.5 Caracterização dos compostos fenólicos do farelo de arroz e de sementes de nim

Para a identificação do perfil de ácidos fenólicos nos extratos de farelo de arroz e de sementes de nim foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado ao detector ultravioleta (HPLC-UV), segundo método previamente elaborado por Souza, (2012) e modificado por Assis, (2012). O equipamento (Shimadzu, Quioto-Japão) era composto por bomba (modelo LC-AT), degaseificador da fase móvel (modelo DGU), controlador (modelo CBM-20A), injetor manual com alça de amostragem de 20 μL (modelo 7725i) e com sistema de detecção espectrofotométrico (modelo SPD-20A), detector UV-Visível 10AXL. O controle do equipamento e aquisição dos dados foi feito pelo software LC Solution. Para separação dos ácidos fenólicos, foi utilizada uma coluna de fase reversa RP-18 CLC-ODS octadecil nas dimensões de 150 x 4,6 mm, com partículas de 5 μm . A eluição foi realizada com fase móvel em gradiente de solução aquosa de ácido acético (99:1, v/v), acetonitrila e metanol que variou conforme o descrito na Tabela 1, com vazão de 1,0 mL/min, perfazendo um tempo total de 18 min.

Tabela 1. Fases móveis usadas para separação dos ácidos fenólicos.

Intervalo de tempo (min)	Comprimento de onda (nm)	Solução		
		água:ácido acético (99:1)	Acetonitrila (%)	Metanol (%)
1-3	270	65	3,5	31,5
3-7	261	57	4,3	38,7
7-10	261	41	5,9	53,1
10-18	277	65	3,5	31,5

A linearidade foi avaliada pela construção de curva analítica com soluções dos padrões dos ácidos fenólicos nas concentrações: 2-37; 11-176; 18-293; 0,4-7; 0,5-8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os ácidos gálico, caféico, salicílico, trans cinâmico e ferúlico, respectivamente. Cada solução foi preparada em triplicata a partir de uma solução trabalho 200, 400, 400, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Os dados de regressão linear foram obtidos com auxílio do software do equipamento.

2.6 Atividade antioxidante dos compostos extraídos de fontes naturais

A capacidade antioxidante do γ -orizanol (extraído do farelo de arroz) e dos compostos fenólicos (extraídos de sementes de nim e de farelo de arroz), totalizando três extratos naturais, foi verificada por quatro métodos.

Para fins de comparação com padrões, foi verificada a atividade antioxidante dos padrões de γ -orizanol e de ácido gálico.

2.6.1 Captura do radical livre DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)

O consumo do radical livre DPPH• pelos extratos naturais foi determinado a partir do decréscimo da unidade de absorvância. As medidas foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis (modelo Cary 100-Varian) em comprimento de onda de 515 nm. Aos tubos contendo 3,0 mL da solução metanólica de DPPH ($5,2 \cdot 10^{-5}$ mol/L) foram adicionados 0,5 mL de metanol (controle) e 0,5 mL do, antioxidante sendo eles: extrato de γ -orizanol (5, 10 e 25 $\mu\text{g/mL}$), γ -orizanol padrão (25 $\mu\text{g/mL}$), extrato fenólico de farelo de arroz (EFF) (1,5; 2 e 3 $\mu\text{g/mL}$), extrato fenólico de sementes de nim (EFN) (3, 6 e 11,5 $\mu\text{g/mL}$) e ácido gálico (3 $\mu\text{g/mL}$). A mistura reativa permaneceu em temperatura ambiente, sem a incidência de luz e a mudança de cor violeta para amarela

foi medida após 0, 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 min de reação (HERRERO et al., 2005).

A capacidade de sequestrar radical livre foi expressa como percentual de inibição de oxidação do radical (I) e calculado conforme Equação 2.

$$I = ((\text{AbsDPPH} - \text{AbsExtr}) / \text{AbsDPPH}) \cdot 100 \quad (2)$$

Em que AbsDPPH é a absorvância da solução de DPPH (controle) e AbsExtr é a absorvância da amostra em solução.

Os valores de CE₅₀, definida como a concentração de antioxidante requerida para sequestrar 50% dos radicais DPPH[•] para o extrato de γ -orizanol, EFF, EFN foram calculados conforme Sá et al., (2012); sendo que para isso, foi construída uma curva traçando concentração do extrato (eixo x) *versus* porcentagem de inibição no tempo de 30 minutos (eixo y).

2.6.2 Captura do radical ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico))

A capacidade de captura do radical catiônico ABTS^{•+} pelos extratos foi realizado de acordo com Rufino et al., (2007). O radical ABTS^{•+} foi gerado pela oxidação do ABTS 7 mM com o persulfato de potássio 2,45 mM após descansar 16 h no escuro à temperatura ambiente. A solução contendo o radical foi diluída em etanol, até obter uma absorvância de $0,700 \pm 0,020$ a 734 nm. Em 3 mL de solução diluída de ABTS^{•+} foram adicionados 30 μ L do antioxidante, sendo eles: extrato de γ -orizanol (35 μ g/mL), γ -orizanol padrão (35 μ g/mL), extrato fenólico de farelo de arroz (EFF) (50 μ g/mL), extrato fenólico de sementes de nim (EFN) (50 μ g/mL) e ácido gálico (10 μ g/mL). As medidas de absorvância foram realizadas a 734 nm após 6 min de reação. Os valores foram expressos em atividade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC) como $\text{mmol}_{\text{Trolox}} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$, usando uma curva de calibração de Trolox (0,1 a 2 μ mol/mL).

2.6.3 Método de redução do ferro (*Ferric Reducing Antioxidant Power* - FRAP)

Esse método avalia a capacidade do antioxidante reduzir o metal Ferro III à Ferro II, formando um complexo de cor azul escuro.

Cada extrato foi preparado em diferentes diluições. As concentrações usadas foram: 300, 500 e 600 μ g mL⁻¹ para o extrato de γ -orizanol, 100 μ g mL⁻¹ para o padrão de γ -orizanol, 90 e 114 μ g mL⁻¹ para o extrato de farelo de arroz (EFF), 120, 130 e 149

$\mu\text{g mL}^{-1}$ para o extrato fenólico de sementes de nim (EFN) e 1, 3 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ácido gálico.

Em ambiente escuro, foi transferida uma alíquota de 90 μL de cada diluição do extrato para tubos de ensaio contendo 270 μL de água destilada. Foi adicionado 2,7 mL do reagente FRAP. A mistura foi homogeneizada e levada ao banho-maria a 37°C. A leitura da absorvância (595 nm) foi realizada após 30 minutos. O reagente FRAP é obtido a partir da combinação de 25 mL de tampão acetato 0,3 M, 2,5 mL de uma solução de TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) 10 mM e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM, devendo ser usado imediatamente após sua preparação. O reagente FRAP foi usado para calibrar o espectrofotômetro. A curva padrão de sulfato ferroso foi construída entre 500 e 2000 μM (RUFINO et al., 2006).

2.6.4 Inibição da oxidação enzimática

A reação de escurecimento enzimático foi realizada a 30°C em pH 6,5 utilizando-se guaiacol 1% como substrato em presença de H_2O_2 0,08% e da enzima peroxidase extraída da batata, além do inibidor enzimático (γ -orizanol 25 $\mu\text{g/mL}$, γ -orizanol padrão 25 $\mu\text{g/mL}$, extrato fenólico de farelo de arroz 30 $\mu\text{g/mL}$, extrato fenólico de sementes de nim 50 $\mu\text{g/mL}$ e padrão de ácido gálico 5 $\mu\text{g/mL}$) (OLIVEIRA et al., 2007).

Os extratos foram adicionados (1 mL) como inibidores da reação e no grupo controle o volume de extrato fenólico foi substituído por água destilada. A reação consistiu em adicionar 1,5 mL de tampão fosfato pH 6,5, 1 mL de água destilada, 1 mL de peróxido de hidrogênio 0,08%; 0,5 mL de guaiacol 1%, 1 mL de inibidor (extrato) e 1 mL de extrato enzimático. O extrato enzimático foi obtido pela mistura de batata com casca e tampão na proporção 1:25. A absorvância foi medida a 470 nm em um espectrofotômetro UV-Vis (modelo Cary 100-Varian) nos tempos 5, 10, 15, 20, 30 e 40 min. A atividade antioxidante foi expressa como o percentual de inibição da reação de escurecimento, em relação ao seu controle (100%) (OLIVEIRA et al., 2007).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização físico-química das matérias-primas

A Tabela 2 apresenta os resultados das médias \pm erro padrão dos elementos de composição centesimal do farelo de arroz e das sementes de nim. A acidez titulável e o

pH foram respectivamente $3,4\% \pm 1,2$ e $6,0 \pm 0,1$ para o farelo de arroz e $10,1\% \pm 2,7$ e $6,0 \pm 0,1$ para as sementes de nim.

Tabela 2. Composição centesimal (%) das sementes de nim e do farelo de arroz.

	Umidade	Lipídios	Cinzas	Proteínas	Fibras	Carboidratos
Farelo de arroz	$8,4 \pm 0,1$	$18,7 \pm 0,8$	$8,9 \pm 0,6$	$20,3 \pm 1,7$	$8,9 \pm 1,4$	$34,8 \pm 0,9$
Sementes de nim	$7,0 \pm 0,1$	$37,4 \pm 0,8$	$6,3 \pm 0,2$	$21,4 \pm 1,0$	$9,2 \pm 0,8$	$18,7 \pm 0,6$

Os valores estão demonstrados como média \pm erro padrão (n=3).

A caracterização geométrica das sementes de nim mostrou que as mesmas apresentam $1,03 \pm 0,11$ cm de comprimento, $0,42 \pm 0,05$ cm de largura e $0,34 \pm 0,06$ cm de espessura.

Os compostos fenólicos totais estavam numa concentração média de $565,6 \pm 3,7$ $\mu\text{g}_{\text{EAG}}/\text{g}$ e $460,2 \pm 2,6$ $\mu\text{g}_{\text{EAG}}/\text{g}$ para o extrato de farelo de arroz e de sementes de nim, respectivamente.

A composição centesimal de ambas matrizes em estudo é bastante semelhante (Tabela 2), com destaque para o elevado teor de lipídios das sementes de nim e o elevado teor de carboidratos do farelo de arroz, que é usado rotineiramente para obtenção do óleo de arroz (PAUCAR-MENACHO et al., (2007).

Os carboidratos são precursores na biossíntese dos compostos fenólicos, mais precisamente na rota do ácido chiquímico (ROSSATO, 2009). Portanto, o farelo de arroz é uma potencial fonte de fitoquímicos com capacidade antioxidante. No caso da semente de nim, o seu elevado conteúdo de lipídios e sua conhecida atividade antioxidante sugerem que, para a proteção dos demais nutrientes, estão presentes compostos que previnem de forma eficiente a iniciação e a propagação de radicais livres, tais como os ácidos fenólicos e seus derivados.

A composição química de um tecido vegetal varia de acordo com vários fatores como: região em que o cereal/fruto é produzido, tipo de solo, clima entre outros (MORO et al., 2004), sendo que no caso da extração de γ -orizanol é interessante que o farelo contenha elevado conteúdo lipídico, pois é onde há maior teor do composto γ -orizanol (PESTANA-BAUER et al., 2012). Assim como nas sementes de nim é interessante que elas não estejam fisicamente alteradas, nem com elevado teor de umidade e nem mesmo em processo de germinação.

3.2 Caracterização do γ -orizanol

3.2.1 Perfil de ácidos graxos

Dos 37 ácidos graxos analisados no extrato de γ -orizanol (Tabela 3), a maior parte é poli-insaturada (51,6%), seguindo os monoinsaturados (32,3%) e os saturados (16,1%).

O ácido alfa-linolênico (18:3n3) apresentou-se em maior quantidade (34,6%), seguido do ácido oléico (18:1n9c) (31,5%), ácido palmítico (16:0) (14,6%), ácido linoléico (18:2n6c) (9,0%) e ácido gama linolênico (18:3n6) (6,5%). Os demais se encontraram em quantidades inferiores a 1%.

Apesar dos ácidos graxos insaturados serem benéficos à saúde, eles também são mais susceptíveis a oxidação (SOARES, 2002), o que pode demandar a ação antioxidante mais intensa do γ -orizanol.

Jesus, (2010) encontrou maior quantidade de ácido oléico seguido de linoléico no óleo de arroz, confirmando que o óleo é rico em ácidos graxos benéficos a saúde.

3.2.2 Perfil dos componentes majoritários do γ -orizanol

Os dados da determinação da linearidade das curvas padrão, usados para a quantificação do γ -orizanol em HPLC-UV, encontram-se na Tabela 4.

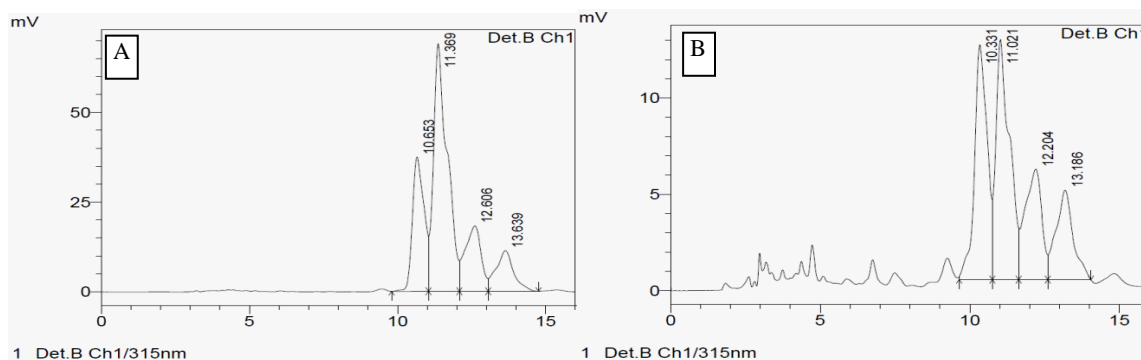
Tabela 4. Curvas analíticas e suas linearidades.

γ -orizanol padrão	Curva analítica	Faixa de concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	r
Cicloartenol ferulato	$y = 19797,41x + 397843,5$		0,987
2,4-metileno cicloartenol ferulato	$y = 64264,56x - 1859822$	30-150	0,988
Campesteril ferulato	$y = 19234,09x - 487221,8$		0,997
β -sitosteril ferulato	$y = 14093,8x - 476330,0$		0,978

r = coeficiente de correlação.

Os componentes majoritários do γ -orizanol estão presentes na amostra com os mesmos tempos de retenção do padrão (Figura 1A), confirmando que os componentes do γ -orizanol estão presentes no extrato do farelo de arroz (Figura 1B).

Figura 1. Cromatograma do γ -orizanol padrão (A) e do extrato do farelo de arroz (B).



3.3 Caracterização dos compostos fenólicos

Os extratos de farelo de arroz (EFF) e de sementes de nim (EFN) apresentaram, respectivamente, 146 e 66 $\mu\text{g g}^{-1}$ como resultado da soma dos ácidos fenólicos: gálico, caféico, ferúlico, salicílico e trans cinâmico. O ácido gálico foi predominante nas duas amostras, representando 67 e 85% para o EFF e EFN, respectivamente. Em nenhum extrato foi identificado o ácido salicílico (Figura 2).

Figura 2. Cromatogramas do extrato fenólico do farelo de arroz (a), extrato fenólico das sementes de nim (b) e dos padrões de ácidos fenólicos (gálico, cafeico, ferúlico, salicílico, trans cinâmico) (c).

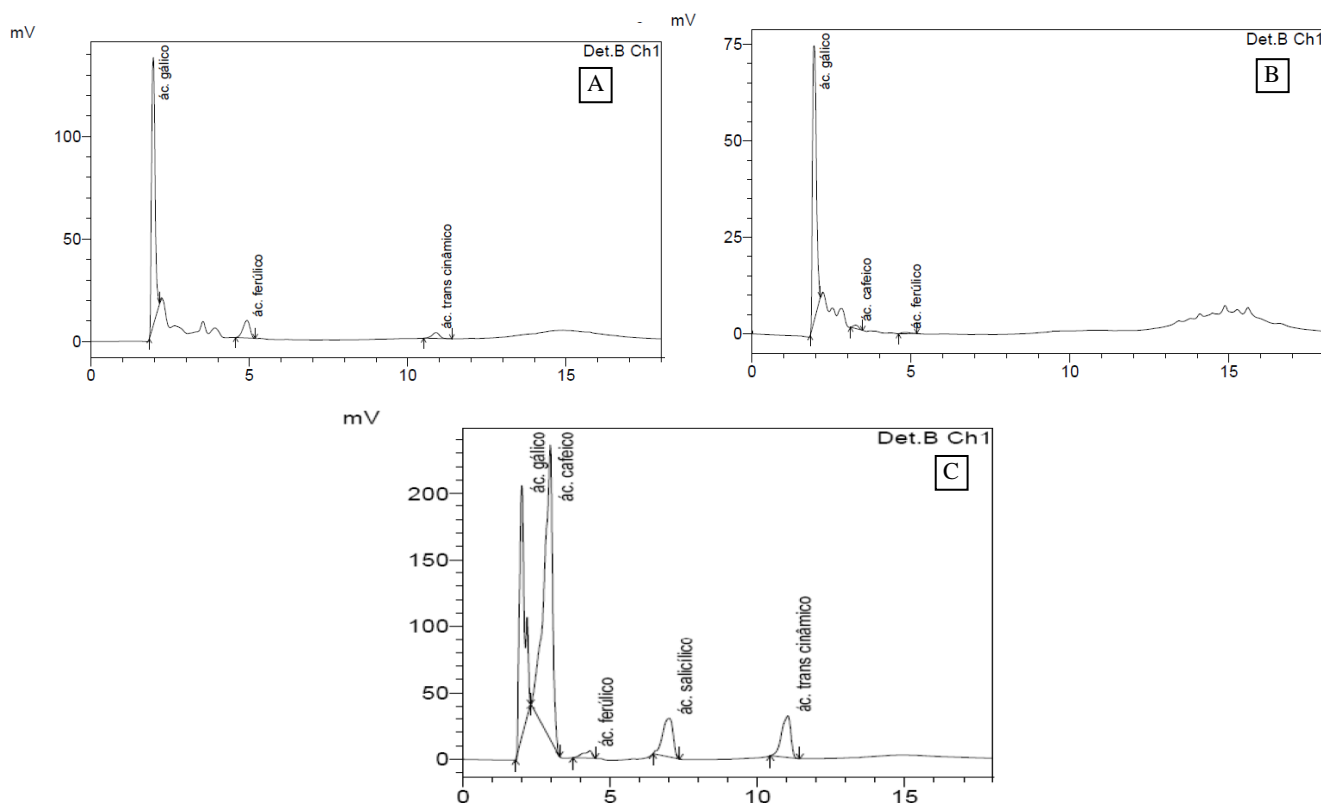


Tabela 3. Composição em ácidos graxos (%) do extrato de γ -orizanol do farelo de arroz.

Saturados		16,13	Monoinsaturados		32,30	Poliinsaturados		51,57
4:0	ácido butírico	0	14:1	ácido miristoléico	0,005	18:2n6c	ácido linoléico	9,057
6:0	ácido capróico	0	15:1	ácido pentadecanóico	0,004	18:2n6t	ácido linoleáidico	0
8:0	ácido caprílico	0	16:1	ácido palmitoléico	0,062	18:3n6	ácido gama - linolênico	6,550
10:0	ácido cáprico	0	17:1	ácido heptadecanóico	0	18:3n3	ácido alfa - linolênico	34,618
11:0	ácido n-undecílico	0	18:1n9c	ácido oléico	31,484	20:2	ácido cis-11,14- eicosadienóico	0,691
12:0	ácido láurico	1,009	18:1n9t	ácido elaídico	0	20:3n6	ácido di-homo-linolênico	0,037
13:0	ácido n-tridecílico	0	20:1n9	ácido eicosanóico	0,636	20:3n3	ácido eicosatrienóico	0,014
14:0	ácido mirístico	0,316	22:1n9	ácido erúcico	0,055	20:4n6	ácido araquidônico - AA	0,004
15:0	ácido n-pentadecílico	0,024	24:1n9	ácido nervônico	0,055	20:5n3	ácido eicosapentaenóico - EPA	0,009
16:0	ácido palmítico	14,618				22:02	ácido cis-13,16- docosadienóico	0,210
17:0	ácido margárico	0				22:6n3	ácido docosahexaenóico	0,380
18:0	ácido esteárico	0,046						
20:0	ácido araquídico	0,004						
21:0	ácido n-heneicosóico	0,006						
22:0	ácido behênico	0,015						
23:0	ácido tricosanóico	0,027						
24:0	ácido lignocérico	0,059						

O ácido gálico pode ter sido predominante em ambas as amostras pelo fato dele ser o primeiro produzido em uma das vias da rota do ácido chiquímico para síntese dos compostos fenólicos (TAIZ; ZEAIGER, 2004).

Os mesmos extratos foram quantificados em espectrofotômetro e tiveram resultados de $260 \mu\text{g g}^{-1}$ (EFF) e $281 \mu\text{g g}^{-1}$ (EFN), respectivamente, ou seja, o resultado foi 1,8 e 4,2 vezes maior em espectro do que em HPLC-UV. Isso pode ter ocorrido porque no espectrofotômetro foram quantificados os compostos fenólicos totais e no HPLC-UV foram quantificados os ácidos fenólicos, que são um dos grupos dos compostos fenólicos totais (MIRA et al., 2008). Além disso, a ocorrência de compostos que absorvem no mesmo comprimento de onda de quantificação dos ácidos fenólicos podem ter contribuído para a superestimação do resultado em espectrofotômetro (750 nm). A presença de outros compostos redutores do reagente de Folin Ciocalteau, além dos fenóis, é também uma possível explicação, pois a reação de Folin é inespecífica, ou seja, o reagente pode ser reduzido não só por ácidos fenólicos, mas também por outros agentes redutores, tais como os fenóis não ácidos.

A determinação da linearidade, estabelecida através da calibração externa em solvente em HPLC-UV, encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5. Equações das curvas analíticas e suas linearidades.

Ácido fenólico	Curva analítica	Faixa de concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	r
Gálico	$y = 62398,52 x - 7107,74$	2-37	0,999
Caféico	$y = 27397,9 x - 66969,55$	11-176	0,998
Salicílico	$y = 2540,131 x + 12159,23$	18-293	0,999
Trans cinâmico	$y = 80248,31 x + 7504,323$	0,4-7	0,998
Ferúlico	$y = 15376,93 - 7337,719$	0,5-8	0,993

3.4 Atividade antioxidante dos compostos extraídos de fontes naturais

A atividade antioxidante foi verificada em três extratos naturais (γ -orizanol, ácidos fenólicos do nim e ácidos fenólicos do farelo de arroz) comparativamente aos padrões de γ -orizanol padrão e de ácido gálico. Foi escolhido esse padrão de ácido

fenólico devido ao seu elevado conteúdo em relação aos fenóis totais nas amostras de farelo de arroz e sementes de nim (Figura 2), além deste ser amplamente usado como controle positivo em determinações de atividade antioxidante (ALVES et al., 2007; SOUZA, 2012).

As concentrações dos extratos e padrões para determinação da atividade antioxidante foram baseadas na literatura e em testes prévios, nos quais foi avaliada a capacidade de atuação do antioxidante em concentrações variadas.

Um dos métodos mais usados para verificar a capacidade antioxidante consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH[•]), de coloração púrpura, pelo antioxidante. O DPPH[•] é reduzido formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H), de coloração amarela (HERRERO et al., 2005). Esse método apresenta vantagens quando os antioxidantes analisados são mais solúveis em solventes orgânicos e, conseqüentemente, os processos oxidativos ocorrem na fração lipídica (LIMA, 2008). Os resultados encontram-se a Tabela 6.

Os ácidos fenólicos foram mais eficazes do que o γ -orizanol, com destaque para o que foi extraído do farelo de arroz, que, na maior concentração usada, apresentou uma capacidade de sequestrar o radical DPPH[•] maior que todos extratos, inclusive quando comparado ao padrão de ácido gálico.

As pesquisas têm se direcionado para a identificação de compostos com atividade antioxidante provenientes de fontes naturais, que possam atuar sozinhas ou sinergicamente com outros aditivos, para serem empregados como alternativa para prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e para limitar o uso dos antioxidantes e agentes conservadores sintéticos (HEMEDA; KLEIN, 1990; OLIVEIRA et al., 2007). No caso da capacidade do γ -orizanol de sequestrar o radical DPPH[•], é possível perceber que a atuação do extrato bruto foi mais eficaz do que o padrão, pois no extrato outras formas químicas estão presentes e atuam sinergicamente na captura do radical livre.

O γ -orizanol (25 μ g/mL) apresentou elevada atividade antioxidante, de 66%, usando uma baixa concentração do extrato (25 μ g/mL).

Tabela 6. Percentual de atividade sequestradora de radical livre (DPPH•) no período de 0-180 min.

Princípio ativo	μg/mL	Tempo (min)									
		0	5	15	30	45	60	90	120	150	180
γ-orizanol	5	7,7 ^{jC}	14,6 ^{iC}	15,1 ^{hC}	16,1 ^{gC}	17,6 ^{fC}	21,7 ^{eC}	24,3 ^{dC}	25,1 ^{cC}	25,3 ^{bC}	25,8 ^{aC}
	10	15,4 ^{iB}	17,7 ^{iB}	20,2 ^{hB}	22,4 ^{gB}	25,1 ^{fB}	26,8 ^{eB}	27,1 ^{dB}	29,7 ^{cB}	30,3 ^{bB}	31,8 ^{AB}
	25	29,4 ^{iA}	33,2 ^{iA}	41,6 ^{hA}	44,5 ^{gA}	48,7 ^{fA}	53,0 ^{eA}	54,4 ^{dA}	58,6 ^{cA}	60,8 ^{bA}	65,7 ^{aA}
γ-orizanol padrão	25	1,7 ⁱ	3,7 ^h	6,8 ^g	7,9 ^f	9,9 ^e	10,9 ^d	11,9 ^c	12,3 ^b	13,1 ^a	13,1 ^a
EF farelo de arroz	1,5	4,5 ^{jC}	23,7 ^{iC}	30,6 ^{hC}	35,8 ^{gC}	39,0 ^{fC}	39,3 ^{eC}	41,7 ^{dC}	43,9 ^{cC}	44,6 ^{bC}	46,2 ^{aC}
	2	7,1 ^{iB}	32,9 ^{iB}	50,0 ^{hA}	57,2 ^{gB}	61,7 ^{fB}	66,5 ^{eA}	74,0 ^{dA}	75,6 ^{cA}	78,3 ^{bA}	81,5 ^{aA}
	3	8,1 ^{iA}	36,0 ^{iA}	49,3 ^{hB}	58,5 ^{gA}	64,2 ^{fA}	65,1 ^{eB}	70,3 ^{dB}	72,1 ^{cB}	72,2 ^{bA}	73,0 ^{AB}
EF sementes de nim	3	1,6 ^{jC}	4,2 ^{iC}	5,7 ^{gC}	5,2 ^{hC}	8,9 ^{fC}	11,0 ^{eC}	11,9 ^{dC}	13,9 ^{cC}	15,1 ^{bC}	16,9 ^{aC}
	6	2,8 ^{iB}	11,1 ^{iB}	16,9 ^{hB}	20,2 ^{gB}	22,7 ^{fB}	24,9 ^{eB}	32,9 ^{dB}	34,1 ^{cB}	35,9 ^{bB}	39,6 ^{AB}
	11,5	8,8 ^{iA}	23,7 ^{iA}	32,5 ^{hA}	38,7 ^{gA}	43,5 ^{fA}	48,7 ^{eA}	54,4 ^{dA}	59,3 ^{cA}	65,5 ^{bA}	69,9 ^{aA}
Ác. gálico padrão	3	13,6 ^j	38,6 ⁱ	39,4 ^h	39,8 ^g	40,7 ^f	41,2 ^e	45,3 ^d	46,1 ^c	46,5 ^b	47,9 ^a

Os valores estão demonstrados como média ± erro padrão (n=3). Letras sobrescritas minúsculas diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa. Letras sobrescritas maiúsculas diferentes na coluna indicam que há diferença significativa para o mesmo extrato (Tukey HSD, p<0,05).

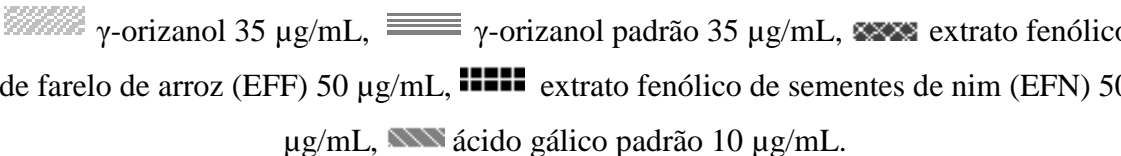
A quantidade de extrato necessária para decrescer a concentração inicial do radical DPPH em 50% (CE₅₀) foi: 29 μg/mL para γ-orizanol, 2 μg/mL para EF de farelo de arroz e 14 μg/mL para EF de sementes de nim. Portanto, o EF de farelo de arroz é o antioxidante mais eficaz, dentre os testados. Ele foi também mais eficaz que o extrato etanólico de cascas de *T. brasiliensis*, que foi estudado por Sousa et al., (2007) e apresentou CE₅₀ de 28 μg/mL.

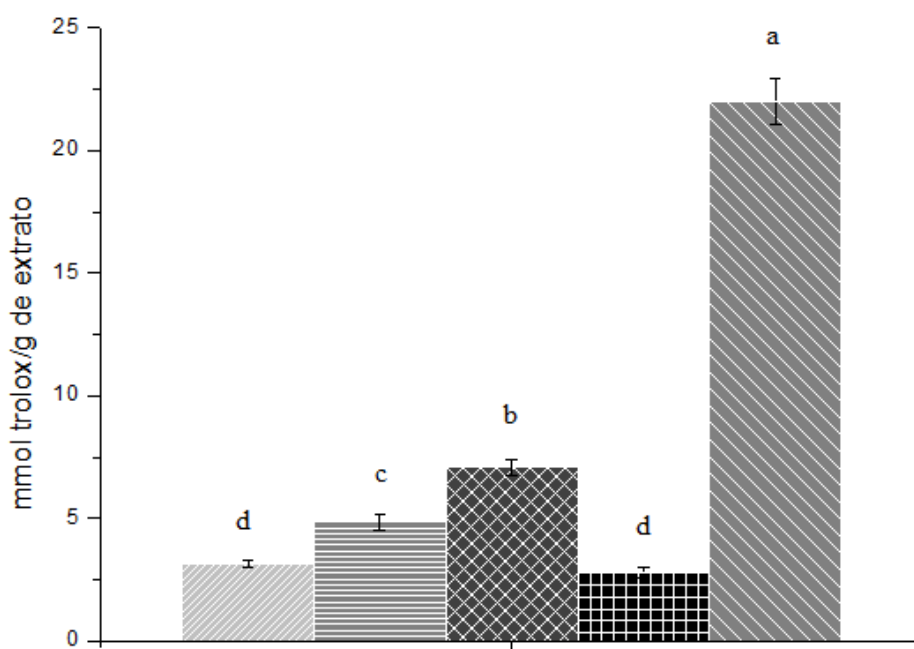
Dentre os métodos químicos usados para se determinar a atividade antioxidante pelo sequestro de radicais livres, o método ABTS^{•+} é um dos mais rápidos e que oferece resultados reprodutíveis, além de outras vantagens como permitir a análise de compostos tanto de natureza lipofílica quanto hidrofílica (KUSKOSKI et al., 2005).

O método do ABTS (2,2-azino-bis(ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) está baseado na habilidade dos antioxidantes em capturar o cátion ABTS^{•+}. Esta captura provoca um decréscimo na absorvância, que é lida a partir da

mistura do radical com o antioxidante após um determinado tempo (6 min) (Figura 4). Este método apresenta vantagem em relação a outros, pois pode ser utilizado tanto para amostras hidrossolúveis quanto lipossolúveis (LIMA, 2008; PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2006; SUCUPIRA et al., 2012).

Os resultados (Figura 3) mostram que o ácido gálico pode ser o principal responsável pela atividade antioxidante dos extratos fenólicos, pois ele possui capacidade destacada de sequestrar o $ABTS^{\bullet+}$. Dentre os extratos naturais, o EFF foi o mais eficaz para estabilizar o $ABTS^{\bullet+}$ (7,1 mmol/g).

Figura 3. Atividade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC) em $mmol_{trolox}/g_{extrato}$.

 γ-orizanol 35 µg/mL, γ-orizanol padrão 35 µg/mL, extrato fenólico de farelo de arroz (EFF) 50 µg/mL, extrato fenólico de sementes de nim (EFN) 50 µg/mL, ácido gálico padrão 10 µg/mL.



Os valores estão demonstrados como média \pm erro padrão (n=3). Letras diferentes indicam que há diferença significativa (Tukey HSD, $p < 0,05$).

Estes resultados estão de acordo com outros autores como Sun et al., (2013), que avaliaram a capacidade antioxidante de EF de folhas de *Tetragium hemsleyanum* e encontraram 1,4 mmol de trolox /g.

Os resultados da atividade antioxidante pelo método FRAP, encontram-se na Tabela 7. Quanto maior o resultado, em $\text{mmol Fe(SO}_4)_2/\text{g extrato}$, maior a capacidade de reduzir o Ferro III e portanto, mais eficaz é o extrato como antioxidante.

Tabela 7. Poder redutor dos extratos.

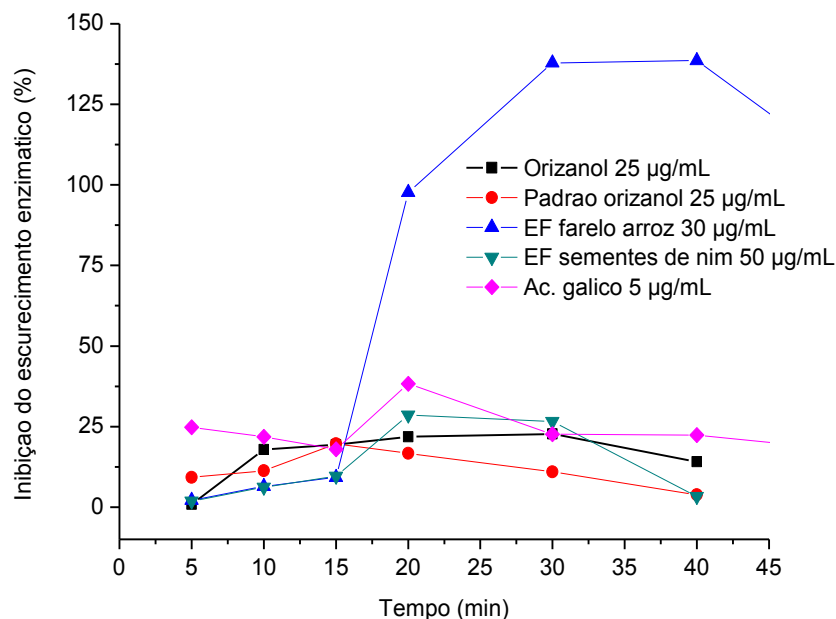
Extrato	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	m mol $\text{Fe(SO}_4)_2/\text{g extrato}$
γ -orizanol padrão	100	38,81 \pm 1,89
Extrato de γ -orizanol	300	9,66 \pm 1,56 ^B
	500	10,69 \pm 1,41 ^B
	600	16,40 \pm 2,23 ^A
EF farelo de arroz	90	252,12 \pm 4,15 ^A
	114	254,66 \pm 8,61 ^A
EF sementes de nim	120	20,54 \pm 0,003 ^B
	130	22,04 \pm 0,82 ^B
	149	35,37 \pm 5,94 ^A
Ác. gálico padrão	1	2591,24 \pm 125,77 ^B
	3	2664,06 \pm 52,75 ^B
	10	3232,31 \pm 192,50 ^A

Os valores estão demonstrados como média \pm erro padrão (n=3). Letras sobrescritas diferentes para o mesmo extrato indicam que há diferença significativa (Tukey HSD, $p < 0,05$).

O padrão de ácido gálico foi o que proporcionou maior capacidade de reduzir o ferro, e dentre os extratos naturais, o EFF se destacou.

A atividade antioxidante também pode se manifestar na inibição dos efeitos de oxidorredutases de escurecimento, como a peroxidase. Esta enzima tem por função oxidar compostos doadores de elétrons (OLIVEIRA et al., 2007). Os resultados estão demonstrados na Figura 4.

Figura 4. Inibição do escurecimento enzimático (%).



Neste trabalho foi observado que o composto com maior teor de fenóis totais: farelo de arroz, foi o que mostrou maior atividade antioxidante. Silva et al., (2009), também verificaram relação direta entre o conteúdo de compostos fenólicos de feijão (*Phaseolus vulgaris L.*) e atividade antioxidante. O γ -orizanol pode ter apresentado menor atividade antioxidante devido ao elevado conteúdo de ácidos graxos insaturados, pois essas estruturas são as mais suscetíveis ao processo oxidativo, havendo uma dependência direta entre o grau de insaturação e a susceptibilidade à oxidação (COSGROVE et al., 1987; SOARES, 2002).

4 CONCLUSÃO

A caracterização dos compostos do farelo de arroz e das sementes de nim mostrou que o γ -orizanol é rico em ácidos graxos insaturados (84%). O ácido gálico foi predominante em ambos os extratos fenólicos, representando 67 e 85% para extrato fenólico do farelo de arroz (EFF) e extrato fenólico das sementes de nim (EFN), respectivamente.

O EFF apresenta atividade antioxidante destacada em relação aos demais extratos naturais para inibir a iniciação do processo, a propagação do radical livre e a catálise enzimática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, C. Q.; BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; LIMA, L. S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. **Revista de rede de ensino FTC**, n. 12, 2007.

ASSIS, L. M. **Atividade antioxidante de extratos de microalgas *Spitulina* LEB-18 e *Chlorella pyrenoidosa* e estudo da sua nanoencapsulação em lipossomas**. 2012. 85 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2012.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official Methods of Analysis of International**. Horwitz, W. (Ed.). 17 ed. Arlington, 2000. (CD – ROM).

BIERHALS, V. S.; MACHADO, V. G.; ECHEVENGUÁ, W. O.; COSTA, J. A. V.; FURLONG, E. B. Compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e antifúngica de multimisturas enriquecidas com a microalga *Spirulina platensis*. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 1, p. 42-48, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Fundação de Ciência e Tecnologia – CIENTEC. **Métodos analíticos para controle de alimentos para uso animal**. INTERLAB VI. Portaria 108, de 4 de setembro de 1991. Diário Oficial da União, 17 de setembro de 1991, seção I, p. 19813.

CAO, L, SI, J.Y.; LIU, Y.; SUN H.; JIN, W.; LI, Z.; ZHAO, X.H.; PAN, R. L. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant properties of *Mosla chinensis* Maxim. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 801-805.

CHAVES, M. B. S. C.; MARCONDES, L. H. Q.; PIVA, P. A.; KONRATH, I.; T.; GRAÇAS, S. B.; GERRERO, A. T. G.; GUILHERMINO, J. F.; YANO, M. Determinação dos teores de fenóis totais, quinonas e atividade antioxidante do noni (*Morindacitrifolia*) e do nim indiano. **Revista de Biotecnologia e Ciência**, v. 1, n. 2, 2013.

CHIM, J. F.; ZAMBIAZI, R. C.; LEITÃO, A. M. Farelo de arroz: capacidade antioxidante de frações ricas em orizanoóis. **Boletim do centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 279-288, 2006.

COSGROVE, J. P.; CHURCH, D. F.; PRYOR, W. A. The kinetics of autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids*. **Champaign**, v. 22, n. 5, p. 299-304, 1987.

FARNOCHI, M. C.; TORRES, A. M.; MAGAN, N.; CHULZE, S. N. Effect of antioxidants and competing mycoflora on *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* populations and fumonisin production on maize grain **Journal of Stored Products Research**, v. 41, p. 211–219, 2005.

FERROCHIO, L.; CENDOYA, E.; FARNOCHI, M. C.; MASSAD, W.; RAMIREZ, M. L. Evaluation of ability of ferulic acid to control growth and fumonisin production of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on maize based media. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, p. 215-220, 2013.

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

HALLIWEL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; AROUMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; NORA, N. S.; BADIALE-FURLONG, E. Extraction of γ -oryzanol from rice bran. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, n. 6, p. 665-673, 2012.

HEMEDA, H. M.; KLEIN, B. P. Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetable extracts. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 1, p. 184-185, 1990.

HERRERO, M., MARTÍN-ÁLVAREZ, P., SEÑORÁNS, F.J., CIFUENTES, A., IBÁÑEZ, E. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. **Food Chemistry**, v. 93, p. 417–423, 2005.

JESUS, S. P. **Recuperação de γ -oryzanol a partir de resíduo da indústria de óleo de arroz utilizando extração supercrítica: avaliação de parâmetros de processo e caracterização dos extratos**. 2010. 143 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Application de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidant en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*caryocar***

brasiliense, camb.). 2008. 181 f. Tese (Doutorado em Bromatologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

METCALFE, L. D.; SCHMITZ, A. A.; PELKA, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. **Analytical Chemistry**, v. 38, n. 3, p. 514-515, 1966.

MIRA, N. V. M.; BARROS, R. M. C.; SCHIOCCHET, M. A.; NOLDIN, J. A.; LANFER-MARQUEZ, U. M. Extração, análise e distribuição dos ácidos fenólicos em genótipos pigmentados e não pigmentados de arroz (*Oryza sativa* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 28, n. 4, p. 994-1002, 2008.

MORO, J. D.; ROSA, C. S.; HOELZEL, S. C. S. M. Composição centesimal e ação antioxidante do farelo de arroz e seus benefícios à saúde. **Disciplinarum Scientia**, v. 4, n. 1, p. 33-44, 2004.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Journal of Nutrition**, v. 29, n. 4, p. 273-300, 1990.

NAWAR, W. W. Lipids. In: FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. 2.ed. New York : Marcel Dekker, 1985.

OLIVEIRA, M. S.; BADIALE-FURLONG, E. Screening of antifungal and antimycotoxigenic activity of plant phenolic extracts. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, n. 2, p. 1-10, 2008.

OLIVEIRA, M. S.; DORS, G. C.; SOUZA-SOARES, L. A.; BADIALE-FURLONG, E. Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, n. 3, p. 267-275, 2007.

PAUCAR-MENACHO, L. M.; SILVA, L. H.; SANT'ANA, A. S. GONÇALVES, L. A. G. Refino de óleo de farelo de arroz (*Oryza sativa* L.) em condições brandas para preservação do γ -orizanól. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 45-53, 2007.

PAVIANI, V. **Efeito do extrato de *Azadirachta indica* (nim) sobre resposta de hipersensibilidade mediada por ácido salicílico em células de *Rubus fruticosus***. 2010. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

PÉREZ-JIMÉNEZ J, SAURA-CALIXTO F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, p. 791-800, 2006.

PESTANA-BAUER, V. R.; ZAMBIAZI, R. C.; MENDONÇA, C. R. B., BENEITO-CAMBRA, M.; RAMIS-RAMOS, G. γ -oryzanol and tocopherol contents in residues of rice bran oil refining. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1479–1483, 2012.

RIBEIRO, P. C. **Propriedades biológicas do óleo das sementes de *Azadirachta indica*: investigação dos mecanismos de ação antioxidante e dos seus efeitos sobre a viabilidade celular**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do ABC, São Paulo, 2013.

ROSSATO, S. B. **Potencial antioxidante e compostos fenólicos de pêssegos (*Prunus persica* L. Batsch)**. 2009. 48 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2009.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). **Comunicado técnico on line da Embrapa**, n. 125, 2006.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS⁺. **Comunicado técnico on line da Embrapa**, n. 128, 2007.

SÁ, P. G. S.; GUIMARÃES, A. L.; OLIVEIRA, A. P.; FILHO, J. A. S.; FONTANA, A. P.; DAMASCENO, P. K. F.; BRANCO, C. R. C. BRANCO, A.; SILVA ALMEIDA, J. R. G. S.; Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 33, n. 4, p. 561-566, 2012.

SHAHIDI, F., JANITHA, P.K., WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SILVA, A. G.; ROCHA, L. C.; CANNIATTI BRAZACA, S. G. Caracterização físico-química, digestibilidade protéica e atividade antioxidante de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 4, p. 591-598, 2009.

SIMIC, M. G., JAVANOVIC, S. V. Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. *In*: HO, C.T., OSAWA, T., HUANG, T.M., ROSEN, R.T. **Food phytochemicals for cancer prevention**. Washington: American Chemical Society, 1994.

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

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

SOUZA, M. M. **Potencial antifúngico, antioxidante e inibidor da síntese de aflatoxinas dos extratos fenólicos de *Chlorella sp.* e *Spirulina platensis***. 2012. Tese 163 f. (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2012.

SOUZA, M. M.; PRIETTO, L.; RIBEIRO, A. C.; SOUZA, T. D.; BADIÁLE-FURLONG, E. Assessment of the antifungal activity of *Spirulina platensis* phenolic extract against *Aspergillus flavus*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1050-1058, 2011.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **Revista Uopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263-269, 2012.

SUN, Y.; LI, H.; HU, J.; LI, J.; FAN, Y. W.; LIU, X. R.; DENG, Z. Y.; Qualitative and quantitative analysis of phenolics in *Tetragonia hemsleyana* and their antioxidant and antiproliferative activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2013 v. 61, n. 44, p. 10507-10515.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Armad Editora, 2004.

TORRES, A.; RAMIREZ, M. L.; ARROYO, M.; CHULZE, S.; MAGAN, N. Potential for control of growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on irradiated maize grain using anti-oxidants. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, p. 319–324 2003.

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

ARTIGO 3

ATIVIDADE DE γ -ORIZANOL NO DESENVOLVIMENTO DE *Fusarium graminearum* CQ244 E MICOTOXINAS

RESUMO

Extratos vegetais podem interferir no ciclo de vida dos fitopatógenos por promover ou inibir seu desenvolvimento. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de γ -orizanol no desenvolvimento de *Fusarium graminearum* CQ244 e na manifestação do seu potencial toxigênico. Para isso, foi adaptado método de determinação simultânea de nivalenol (NIV), deoxinivalenol (DON) e zearalenona (ZEA) na biomassa fúngica. A ação antifúngica do γ -orizanol foi comparada aos fungicidas sintéticos azoxistrobina e trifloxistrobina. Em placas de Petri contendo meio batata dextrose ágar, foi adicionado γ -orizanol extraído de farelo de arroz em diferentes concentrações (0,1; 0,3; 0,5; 0,8, 1,0 e 1,2 g/kg) e também os fungicidas azoxistrobina (0,2 mg/kg) e trifloxistrobina (0,4 mg/kg). Discos de micélio de *Fusarium graminearum* CQ244 (0,5 cm) foram colocados nas superfícies dos meios solidificados e as culturas foram incubadas em estufa BOD (25°C, 7 dias). Foram realizadas determinações de glicosamina, ergosterol e medida do halo como indicativos do desenvolvimento fúngico. As micotoxinas NIV, DON e ZEA foram extraídas dos meios usando método QuEChERS e quantificadas usando HPLC/DAD. A inibição fúngica por γ -orizanol é maior que a proporcionada pelos fungicidas sintéticos, além de inibir a produção de NIV, DON e ZEA. O estudo dos compostos estruturais do fungo, além da medida do micélio, contribui para a compreensão do mecanismo de ação do γ -orizanol em relação aos fungicidas sintéticos.

Palavras-chave: antifúngico, tricotecenos, zearalenona.

1 INTRODUÇÃO

O arroz é um cereal consumido na forma de grãos inteiros e seu beneficiamento corresponde um conjunto de operações industriais para obtenção de arroz integral, polido ou parboilizado. O grão de arroz é composto por aproximadamente 20% de casca, 70% de endosperma e 10% de farelo e germe. Os subprodutos do beneficiamento do arroz incluem a casca, o arroz quebrado e o farelo, que constituem um desafio para agroindústria (FERREIRA et al., 2005; LUH, BARBERS; BARBER, 1991).

De todos os compostos lipofílicos bioativos encontrados nas camadas externas de grãos de arroz, a vitamina E e o γ -orizanol são de maior interesse científico em função dos potenciais benefícios à saúde (PASCUAL et al., 2013). O γ -orizanol, formado pela esterificação do ácido trans-ferúlico e esteróis ou triterpenóides, é bem conhecido e considerado o principal composto bioativo no arroz integral devido a sua atividade antioxidante (ISMAIL et al., 2010; JEONG-YONG et al., 2012; JULIANO et al., 2005; LERMA-GARCIA et al., 2009).

Embora a literatura venha demonstrando que os compostos antioxidantes podem atuar como antifúngicos e inibidores da produção de micotoxinas (OLIVEIRA et al., 2007; RASOOLI; ABYANEH, 2004; SOUZA et al., 2010) não são encontrados estudos que demonstrem a atividade antifúngica do γ -orizanol. No entanto, dentre os cereais, o arroz é o menos susceptível a contaminação fúngica no campo (KYUNG-EUN, BYUNG; CHAN, 2010), o que pode estar relacionado com a presença do γ -orizanol. Dentre os fungos que contaminam cereais no campo e possuem espécies toxigênicas se destacam os do gênero *Fusarium* que, em função das variáveis bióticas e abióticas, produzem micotoxinas. As toxinas desse gênero são conhecidas como fusariotoxinas e pertencem a diferentes classes químicas: tricotecenos (como nivalenol e deoxinivalenol), zearalenona, fumonisinas, moniliformina e ácido fusárico (DORS, 2010; HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2011a; REYES-DOMINGUES et al., 2012). Poucos são os estudos envolvendo condições para extração destas micotoxinas da biomassa fúngica cultivada, pois, em situações naturais, elas são usualmente encontradas em matrizes de cereais.

Os fungicidas sintéticos, como azoxistrobina e trifloxistrobina, são conhecidos como uma alternativa para reduzir os fungos em culturas de cereais, entre eles o arroz, e seu emprego tem aumentado, gerando preocupação aos serviços de saúde e aos consumidores pelo fato de sua toxicidade residual estar sendo associada a câncer, além da degradação ambiental e seleção de espécies microbianas resistentes (MARTINEZ-ROMERO et al., 2008). Preocupações com o meio ambiente e a busca crescente por alimentos livres de compostos tóxicos sintéticos usados para proteger as culturas motivaram este estudo, cujo objetivo foi avaliar o efeito de γ -orizanol no desenvolvimento de *Fusarium graminearum* CQ244 e na manifestação do seu potencial toxigênico. Para isso, foi adaptado método de determinação simultânea de nivalenol (NIV), deoxinivalenol (DON) e zearalenona (ZEA) na biomassa fúngica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria-prima e padrões analíticos

O farelo de arroz utilizado para extração do γ -orizanol foi obtido de uma empresa arroseira da região Sul do Rio Grande do Sul. Ele foi homogeneizado, separada a fração de granulometria inferior a 35 mesh e armazenado à -18°C até o uso.

Os padrões de micotoxinas (NIV, DON e ZEA) e de fungicidas (azoxistrobina e trifloxistrobina) foram adquiridos da Sigma Aldrich, USA (grau de pureza $\geq 98\%$). O padrão de γ -orizanol foi adquirido da Wako Chemicals, USA (grau de pureza = 98%).

2.2 Preparo dos antifúngicos sintéticos e natural

Os fungicidas sintéticos foram preparados pela diluição dos padrões de azoxistrobina e trifloxistrobina em água de forma a perfazer uma concentração de 0,04 mg/mL.

O γ -orizanol foi extraído de acordo Heidtmann-Bemvenuti et al., (2012a), utilizando-se 10 g de farelo de arroz, que foi suspenso em 50 ml de água destilada. O ácido ascórbico (2 g) foi adicionado à mistura que foi então agitada em vórtex por 2 min e incubou-se a 40°C durante 40 min. Setenta e cinco mililitros de hexano:isopropanol (1:3) foram adicionados, utilizou-se vórtex por 30 s, e após, o conteúdo foi centrifugado a 1320 g durante 15 min. A camada orgânica foi separada em um funil de separação. O resíduo da centrifugação foi misturado com 10 mL de hexano:isopropanol e centrifugado novamente. A camada orgânica foi combinada com a anterior e evaporada sob vácuo a 70°C. A absorção foi medida em um espectrofotômetro UV-Vis (modelo Cary 100-Varian) à 326 nm de comprimento de onda para estimar a concentração.

2.3 Testes prévios à extração de micotoxinas

As condições para extração simultânea das micotoxinas foi estudada empregando cromatografia de camada fina de alta eficiência (HPTLC - *High Performance Thin Layer Chromatography*), tendo a recuperação como indicativo de seis métodos disponíveis na literatura, que diferiam com relação à matriz alvo, o tipo e quantidade de solvente e sais utilizados.

Placas de Petri contendo 15 mL de meio batata dextrose ágar (BDA) foram fortificadas com as micotoxinas em um nível três vezes superior ao limite de detecção das toxinas em HPTLC ($3 \times \text{LOD} = 0,219 \mu\text{g}$ para DON, $0,150 \mu\text{g}$ para NIV e $0,229 \mu\text{g}$ para ZEA) (HEIDTMANN-BEMVENUTI, 2011b). Após 24 horas, foi realizada a extração conforme protocolos da literatura (HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2012b; MONACI et al., 2011; NIELSEN; SMEDSGAARD, 2003; SOSPEDRA et al., 2010; VACLAVIK et al., 2010; ZACHARIASOVA et al., 2010). A cuba de eluição continha tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (30:20:5). Após pingar cada extrato nas placas de

HPTLC, a mesma foi revelada com solução metanólica de cloreto de alumínio (15%) e levada à estufa a 130°C por 10 minutos.

A resposta foi avaliada qualitativamente através da comparação da intensidade de luz do padrão de cada micotoxina entre os seis métodos testados.

O método que proporcionou a maior intensidade de luz (VACLAVIK et al., 2010) foi melhorado através de dois planejamentos fatorial 2^2 , um deles usando agitação por vórtex e o outro orbital. As variáveis testadas no planejamento foram quantidade de acetonitrila:água (mL) e proporção de $MgSO_4:NaCl$ (g) (Tabela 1). O procedimento consistia em adicionar água destilada e acetonitrila ao meio recortado, levar ao vortex por 4 min (ou agitador orbital por 20 min), adicionar os sais ($MgSO_4$ e $NaCl$), levar ao vortex por 3 min (ou agitador orbital por 15 min) e centrifugar (5 min, 3220 g, 20°C). Após, recolher uma alíquota de 4 mL da fase orgânica para um frasco e secar. A resposta adotada para estabelecer a melhor condição de extração foi o percentual de recuperação das micotoxinas, que foi calculada empregando o procedimento fotométrico desenvolvido por Hoeltz et al., (2010), usando o programa *ImageJ* (Tabela 2; Figura 2). Nesse procedimento, é feita uma curva padrão com a intensidade de luz obtida para cada ponto do padrão de cada micotoxina (intensidade de luz *versus* concentração) e a intensidade de luz obtida para a amostra é substituída na curva e então encontra-se a concentração da micotoxina na amostra.

Tabela 1. Matriz do planejamento experimental com os valores reais e codificados.

Experimento		H ₂ O:Acetonitrila (mL)	MgSO ₄ :NaCl (g)
Agitador tipo vórtex	Agitador orbital		
1	8	7,5:12,5 (-1)	1:4 (-1)
2	9	12,5:7,5 (+1)	1:4 (-1)
3	10	7,5:12,5 (-1)	4:1 (+1)
4	11	12,5:7,5 (+1)	4:1 (+1)
5	12	10:10 (0)	2,5:2,5 (0)
6	13	10:10 (0)	2,5:2,5 (0)
7	14	10:10 (0)	2,5:2,5 (0)

Tabela 2. Massa dos padrões usados para curva cromatográfica em HPTLC.

Micotoxinas	Massas das micotoxinas nas placas HPTLC (ng)					
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6
NIV	75	105	135	150	165	180
DON	108	153	195	219	240	270
ZEA	114	159	204	228	249	273

2.4 Avaliação da atividade antifúngica e antimicotoxinas

A atividade antifúngica e antimicotoxinas de γ -orizanol, azoxistrobina e trifloxistrobina foi verificada contra o fungo *F. graminearum* CQ244.

2.4.1 Isolamento e crescimento do fungo *F. graminearum* CQ244

O fungo usado neste trabalho foi cedido pelo laboratório de Epidemiologia de Plantas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), onde foi isolado da cevada (CQ244) e identificado baseado em observações das estruturas do micélio e esporos em microscópio comparando com a literatura (ASTOLFI et al., 2010).

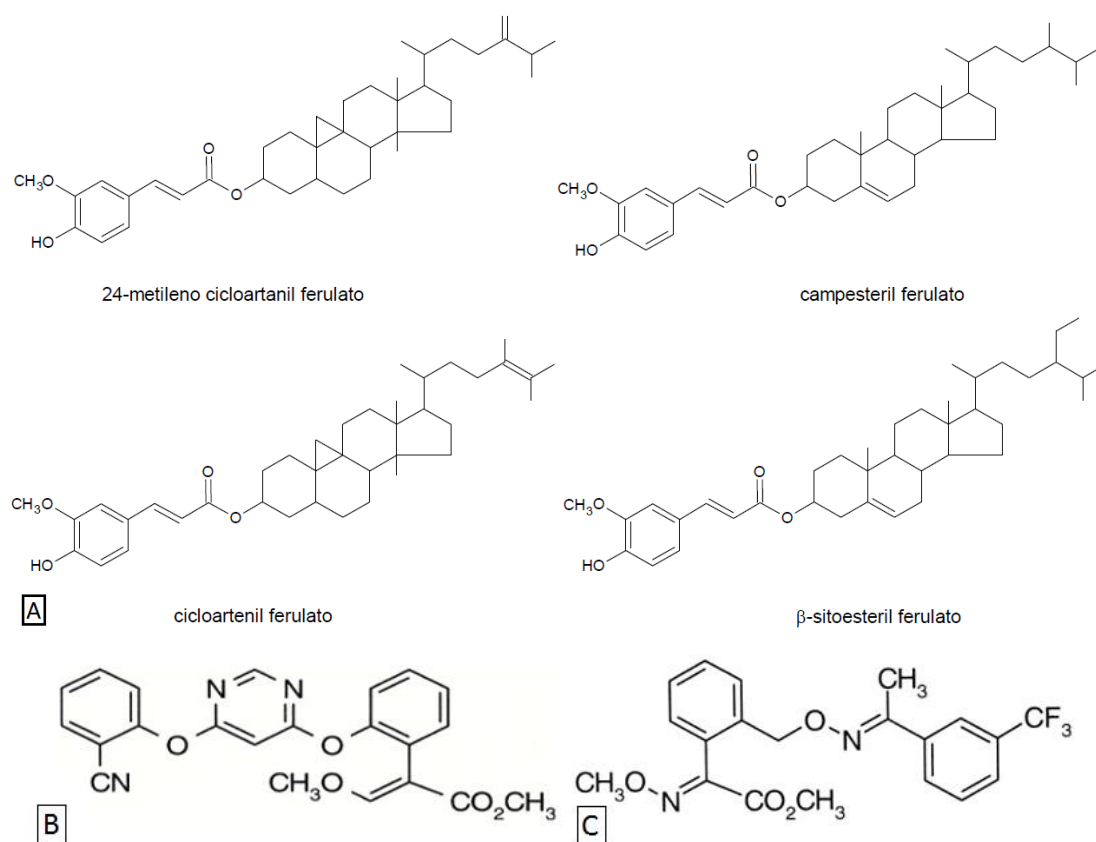
A cultura foi incubada em *Spezieller Nährstoffarmer Agar* (SNA) à 25°C para esporulação e mantida a 4°C em meio SNA. Para realização do experimento, o fungo foi repicado para meio de Batata Dextrose Agar (BDA) e incubado por 7 dias à 25°C em estufa BOD (12 h claro/12 h escuro).

2.4.2 Inoculação e incubação

Discos de micélio de 0,5 cm de diâmetro da cultura do fungo foram colocados no centro da placa de Petri de 8 cm de diâmetro contendo 20 mL de BDA 3,9% e o inibidor fúngico (natural ou sintético). No meio controle não foi adicionado inibidor (PAGNUSSATT et al., 2013).

O γ -orizanol foi adicionado ao meio de forma a perfazer as concentrações de 0,1; 0,3; 0,6; 0,8, 1,0 e 1,2 g/kg e os fungicidas sintéticos foram usados nas concentrações de 0,2 mg/kg para azoxistrobina e 0,4 mg/kg para trifloxistrobina, sendo esses últimos baseados nos limites máximos permitidos pela legislação brasileira em cultura de arroz (ANVISA, 2003; ANVISA 2005). As estruturas químicas do γ -orizanol, azoxistrobina e trifloxistrobina estão apresentadas na Figura 1.

Figura 1. Estrutura dos componentes majoritários do γ -orizanol (A), do azoxistrobina (B) e do trifloxistrobina (C).



As culturas foram incubadas em estufa BOD (12 h claro /12 h escuro) por 7 dias. No último dia de inoculação (7º dia), as placas foram armazenadas em temperatura de congelamento (-8°C) para posterior realização das determinações de glicosamina, ergosterol e micotoxinas. A inibição foi avaliada pela comparação das respostas destas determinações nas placas controle (NGUEFACK et al., 2004; SOUZA et al., 2010).

A concentração mínima inibitória (CMI) foi definida como a concentração mínima em g/kg na qual não foi observado crescimento do micélio.

2.4.3 Medida do desenvolvimento fúngico

Para verificar o potencial antifúngico dos extratos, foi usado o método de diluição em ágar (PAGNUSSATT et al., 2013). Os indicativos de desenvolvimento fúngico foram avaliados no 7º dia de cultivo através da determinação de compostos estruturais da parede (glicosamina) e membrana fúngica (ergosterol) (ANEXO 4). O halo foi medido diariamente (em quadruplicata) de forma ortogonal e obtendo-se 3

medidas por placa (GUTAROWSKA; ZAKOWSKA, 2009; PAGNUSATT et al., 2013; SOUZA et al., 2011).

Foram utilizadas curvas padrão de glicosamina (3 à 20 $\mu\text{g}_{\text{glicosamina}}/\text{mL}$) e ergosterol (1,5 à 13,5 $\mu\text{g}_{\text{ergosterol}}/\text{mL}$). A porcentagem de inibição fúngica (I) foi calculada de acordo com a Equação 1.

$$I = \frac{(\text{controle} - \text{tratamento})}{\text{controle}} \times 100 \quad (1)$$

2.4.4 Determinação de micotoxinas

As micotoxinas nivalenol (NIV), deoxinivalenol (DON) e zearalenona (ZEA) foram extraídas dos meios usando método QuEChERS modificado (VACLAVIK et al., 2010) e quantificadas usando HPLC/DAD (*High Performance Liquid Chromatography* com *Diode Array Detector*).

A extração consistiu em adicionar 7,5 mL de água destilada e 12,5 mL de acetonitrila ao meio contendo a biomassa fúngica, agitar em mesa orbital por 20 min, adicionar os sais (4 g de MgSO_4 e 1 g de NaCl) e agitar por mais 15 min. Foram recolhidos 4 mL da fase orgânica resultante da centrifugação (5 min, 3220 g, 20°C) para um frasco (VACLAVIK et al., 2010). O resíduo seco foi armazenado sob congelamento até o momento da quantificação, quando foi ressuspenso em 1 mL de acetonitrila.

A quantificação foi feita usando HPLC-DAD acoplado na coluna C18 Sulpeco (250 x 4,6 mm, com partículas de 10 μm). As condições da corrida cromatográfica foram: fase móvel água:metanol (88:12, v/v) a 0,8 ml/min por 8 min, metanol a 1 ml/min por 10 min e água:metanol (88:12, v/v) a 0,8 ml/min por 9 min, totalizando 27 min (BARROS et al., 2008).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Extração simultânea de micotoxinas do cultivo microbiano

Dentre os seis métodos testados para extração de NIV, DON e ZEA, o que proporcionou maior recuperação simultânea das três micotoxinas estudadas (VACLAVIK et al., 2010) foi adaptado através de dois planejamentos fatorial 2^2 , um usando agitador tipo vórtex e outro usando agitador orbital.

A Tabela 3 apresenta os resultados de recuperação das micotoxinas em cromatografia em camada delgada (HPTLC) usando agitador tipo vórtex e orbital.

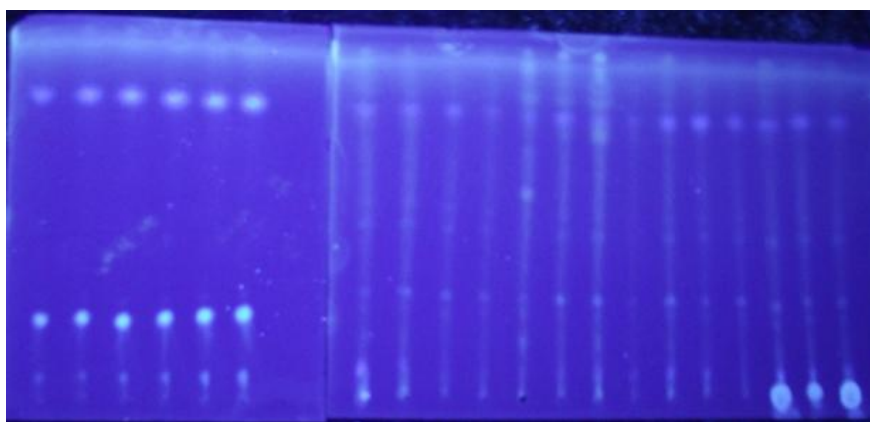
Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente oscilam entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ (GARP, 1999).

Tabela 3. Recuperação em HPTLC para NIV, DON e ZEA.

Tipo de agitação	Experimento	Recuperação (%)		
		NIV	DON	ZEA
Agitador tipo vórtex	1	119,7	68,2	89,6
	2	100,4	72,0	87,0
	3	88,2	68,8	83,9
	4	86,5	65,7	77,5
	5	87,1	65,7	79,9
	6	88,2	65,6	83,4
	7	96,0	73,0	80,2
Agitador orbital	8	77,3	70,7	68,8
	9	90,0	55,2	79,7
	10	79,5	67,0	79,7
	11	69,8	55,6	69,0
	12	90,6	54,9	66,0
	13	81,5	55,8	66,0
	14	76,7	51,4	59,3

A Figura 2 mostra o cromatograma, onde os seis primeiros pontos correspondem aos padrões em ordem crescente de concentração, e os demais correspondem, respectivamente, aos 14 experimentos descritos na Tabela 1. O R_f do NIV, DON e ZEA foram, respectivamente, 0,04; 0,2 e 0,9.

Figura 2. Cromatograma do HPTLC contendo os padrões em ordem crescente de concentração (6 primeiros pontos) e os 14 experimentos do planejamento descritos na Tabela 3.



Todas as condições propiciaram recuperação de acordo com o recomendado por GARP, (1999) (Tabela 3). A micotoxina DON foi a que apresentou recuperações mais baixas. Este fato pode ser atribuído a saturação dos solventes extratores com as demais micotoxinas em estudo. Recuperação maior que 100% foi verificada para NIV nos experimentos 1 e 2, possivelmente pela presença de interferentes com Rf similar ao da micotoxina.

É importante salientar que, em alguns casos, os experimentos que utilizaram vórtex tiveram recuperações maiores do que os que usaram o agitador orbital. Porém, devido a maior facilidade de controle da operação (tempo e velocidade) para garantir a repetibilidade, optou-se por escolher o experimento de número 10 (Tabela 3) para realizar as extrações simultâneas das micotoxinas de *Fusarium*.

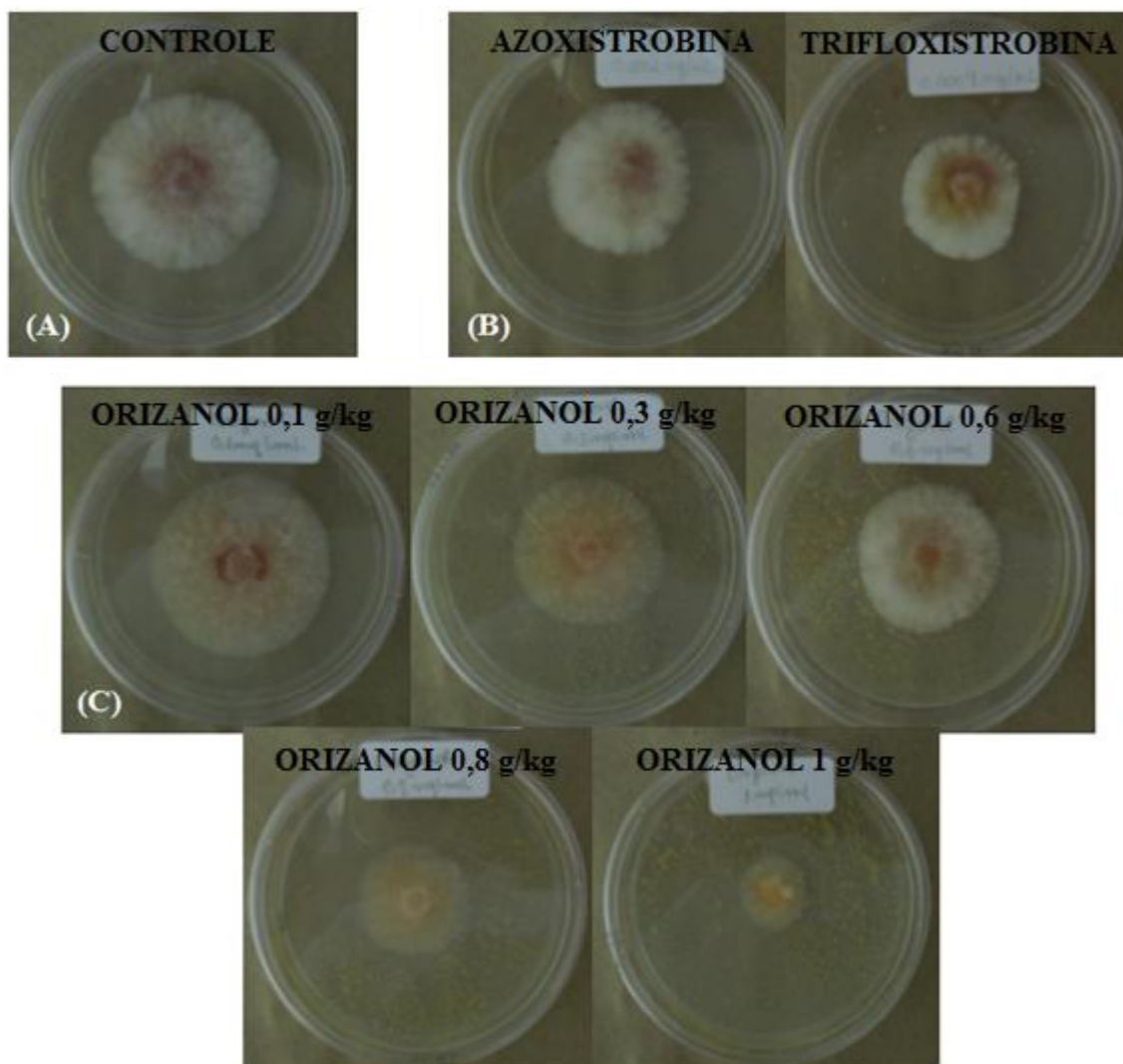
Nessas condições, as recuperações de NIV, DON e ZEA foram 80, 67 e 80%, respectivamente, sendo considerado dentro dos limites de confiabilidade, de acordo com Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas (GARP, 1999). Além disso, neste experimento as condições de agitação possibilitam extrações concomitantes proporcionando aplicação em rotina de monitoramento.

As proporções dos solventes (mL) acetonitrila (7,5):água (12,5) e dos sais (g) MgSO₄ (4):NaCl (1) recomendadas para a extração de NIV, DON e ZEA a partir do cultivo propiciam extração eficiente dos analitos, com geração mínima de resíduos para o meio ambiente.

3.2 Atividade antifúngica de composto natural (γ -orizanól) e sintéticos (azoxistrobina e trifloxistrobina) contra *F. graminearum* CQ244

O halo proveniente da cultura de *F. graminearum* CQ244 já no 3º dia de cultivo mostrava que, ao aumentar a concentração do γ -orizanól, ocorria uma diminuição do micélio (Figura 3). Dentre os fungicidas químicos, o trifloxistrobina inibia mais a formação do halo do que o azoxistrobina.

Figura 3. Halos no 3º dia de crescimento de *F. graminearum* CQ244 nos meios: (a) controle; (b) contendo os fungicidas azoxistrobina (0,2 mg/kg) e trifloxistrobina (0,4 mg/kg), respectivamente e (c) contendo γ -orizanól nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,6; 0,8 e 1,0 g/kg, respectivamente.

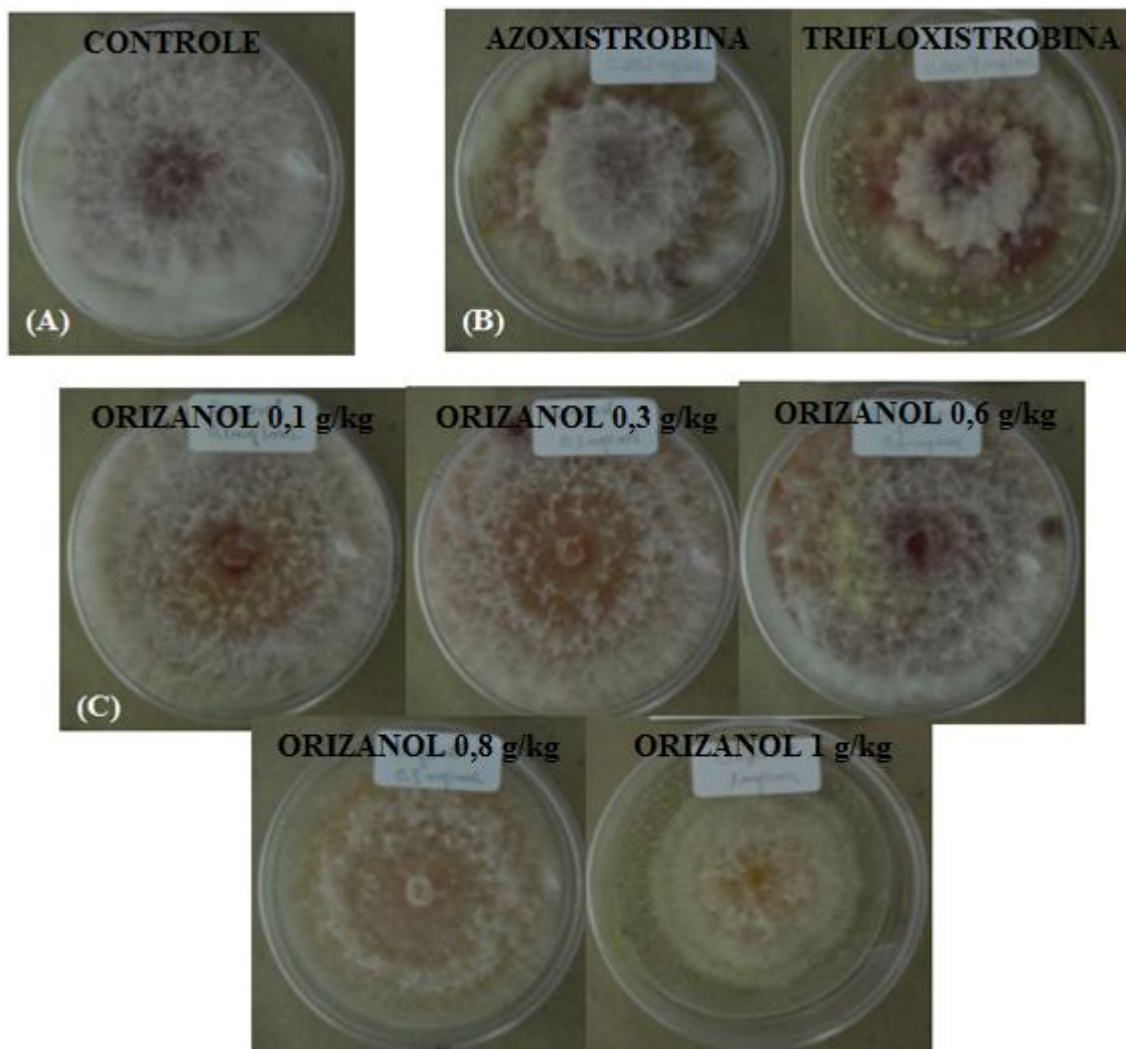


No 7º dia (Figura 4), os antifúngicos trifloxistrobina e γ -orizanol (1 g/kg) ainda inibiam o desenvolvimento fúngico, enquanto os demais antifúngicos se igualavam ao halo do controle. Não houve crescimento do fungo quando foi usado γ -orizanol 1,2 g/kg, sendo, portanto, esta a concentração mínima inibitória (CMI).

Esses resultados estão de acordo com outros autores como Yamamoto-Ribeiro et al., (2013) que estudaram o efeito do óleo de gengibre contra *Fusarium verticillioides* empregando concentrações entre 0,5 e 5 mg/kg e encontraram uma CMI de 2,5 mg/kg.

É importante salientar que a concentração do fungicida químico usado é menor que a do antifúngico natural, pois para o estudo daquele, foi levado em consideração o Limite Máximo Residual (LMR) que pode ser encontrado no arroz beneficiado. Esse valor é baixo, pois representa o máximo que pode ser encontrado no alimento para consumo, que no caso do arroz é 0,1 mg/kg para azoxistrobina e de 0,2 mg/kg para trifloxistrobina. Acima desses limites, os fungicidas podem causar danos à saúde da população e, no caso do arroz, essa situação é mais preocupante, pois é um cereal consumido diariamente por grande parte da população nos países produtores e usuários deste cereal.

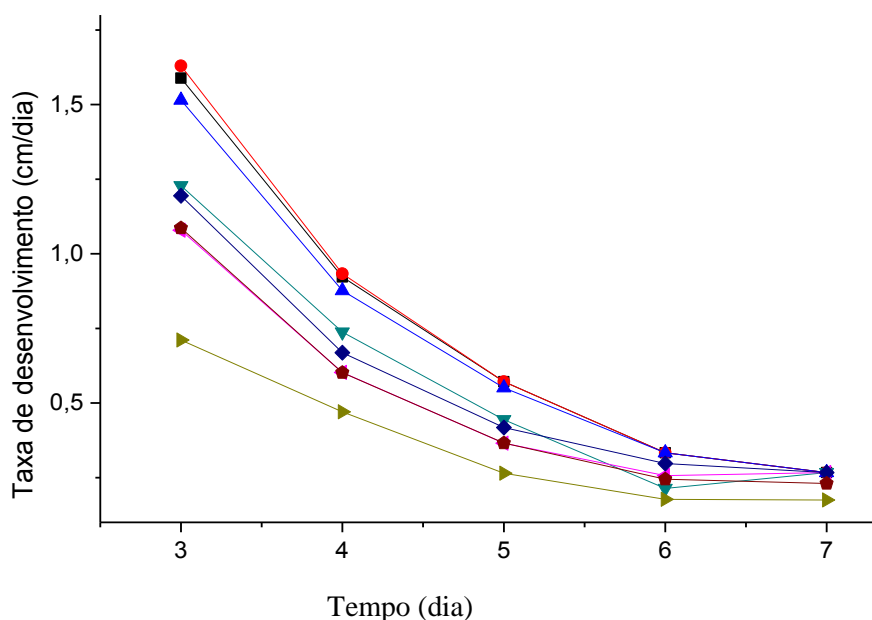
Figura 4. Halos no 7º dia de crescimento de *F. graminearum* CQ244 nos meios: (a) controle; (b) contendo os fungicidas azoxistrobina (0,2 mg/kg) e trifloxistrobina (0,4 mg/kg), respectivamente e (c) contendo γ -orizanol nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,6; 0,8 e 1 g/kg, respectivamente.



Houve uma redução na taxa de formação de hifas do fungo (cm/dia) ao longo dos 7 dias, sendo possível observar que o γ -orizanol (1 g/kg) foi o que mais reduziu a taxa de desenvolvimento (Figura 5) chegando a uma inibição de formação de hifas de 37%, contra 14% por trifloxistrobina. Com o emprego dos demais antifúngicos, os halos de desenvolvimento se igualaram ao do controle no último dia de acompanhamento.

Figura 5. Taxa de desenvolvimento do *F. graminearum* CQ244 (cm/dia).

—■— controle, —●— γ -orizanol (0,1 g/kg), —▲— γ -orizanol (0,3 g/kg), —▼— γ -orizanol (0,6 g/kg), —◆— γ -orizanol (0,8 g/kg), —▶— γ -orizanol (1 g/kg), —◆— azoxistrobina (0,2 mg/kg), —●— trifloxistrobina (0,4 mg/kg).



Pagnussatt et al., (2014) avaliaram a redução do desenvolvimento de *F. graminearum* e *F. meridionale* e demonstraram que o extrato fenólico de *Spirulina* inibia a formação do halo de forma mais eficiente que os ácidos fenólicos sintéticos testados.

Oliveira et al., (2008) relataram que compostos antioxidantes podem atuar como antifúngicos e inibidores da produção de aflatoxinas. Segundo os autores, a inibição da síntese de aflatoxina se deve a diminuição da peroxidação lipídica e consequente estresse oxidativo que está relacionado a biosíntese da toxina.

A Tabela 4 mostra os resultados das médias e da porcentagem de inibição fúngica (%) demonstradas pelo halo, glicosamina e ergosterol.

Tabela 4. Medidas do desenvolvimento de *F. graminearum* CQ244 em presença e ausência de antifúngicos.

Antifúngico	Concentração	Halo		Glicosamina		Ergosterol	
		Média±EP (cm)	Inibição (%)	Média±EP (mg/g)	Inibição (%)	Média±EP (mg/g)	Inibição (%)
Controle		8±0		31,0±2,9		1,4±0,3	
Azoxistrobina	0,2 mg/kg	8±0	0,0	16,0±2,1	48,3	1,2±0,1	15,1
Trifloxistrobina	0,4 mg/kg	6,9±0	13,6	16,1±3,4	48,0	1,3±0,3	10,5
Orizanol	0,1 g/kg	8±0	0,0	19,2±2,6	38,0	1,4±0,2	0,6
Orizanol	0,3 g/kg	8±0	0,0	15,9±3,1	48,6	0,9±0,1	32,0
Orizanol	0,6 g/kg	8±0	0,0	13,2±3,5	57,3	0,9±0,1	34,8
Orizanol	0,8 g/kg	8±0	0,0	7,1±0	77,1	0,9±0,1	31,6
Orizanol	1 g/kg	5,0±0,9	36,8	20,7±0,5	33,2	0,9±0,1	35,6

Valores demonstrados como média±erro padrão (EP) (n=3).

O γ -orizanol, um óleo de cor amarelo escuro e com odor característico, teve rendimento de extração do farelo de arroz de 1,4%. Outros autores (KEDIA et al., 2014) encontraram um rendimento em óleo essencial de sementes de *Cuminum cyminum* (cumin) variando entre 0,9 e 1,2%.

O γ -orizanol apresentou inibição destacada quando comparado aos fungicidas químicos. É interessante destacar que o γ -orizanol, na mais baixa concentração utilizada (que é aproximadamente cem vezes menor que a encontrada no farelo de arroz), estimulou o halo do fungo (Figura 5) e, praticamente, não inibiu o ergosterol (Tabela 4). Este fato pode estar associado à presença de compostos que possuem tanto atividade antifúngica, como também compostos que estimulam o crescimento dos patógenos, como ocorre na natureza. Em concentrações maiores, os compostos que estimulam ficam suprimidos pelos que inibem. Cabe lembrar também que na planta o γ -orizanol atua de forma sinérgica com outras famílias químicas que inibem a multiplicação fúngica.

Dentre os compostos estruturais do fungo estudados, a glicosamina (parede) foi mais inibida pelos antifúngicos do que o ergosterol (membrana), sugerindo que o γ -orizanol tem papel importante diminuindo a eficiência do sistema de proteção da célula fúngica. A redução da produção de componentes da parede celular de espécies fúngicas

por extratos fenólicos de *Spirulina* foi demonstrada por outros autores (PAGNUSSATT et al., 2014; SOUZA et al., 2011).

O γ -orizanol inibiu a produção de compostos estruturais do fungo em todas as concentrações usadas. A inibição de glicosamina variou de 38% (para γ -orizanol 0,1 g/kg) a 77% (para γ -orizanol 0,8 g/kg). A inibição do ergosterol variou de 0,6% (para γ -orizanol 0,1 g/kg) a 36% (para γ -orizanol 1,0 g/kg).

O fungicida azoxistrobina inibiu em 48% a produção de glicosamina e 15% a de ergosterol; e o trifloxistrobina inibiu em 48% a glicosamina e 10% o ergosterol. O que demonstra que o γ -orizanol pode ser mais eficaz para inibir o fungo do que os fungicidas sintéticos.

No estudo de Pagnussatt et al., (2013), usando extrato fenólico durante o cultivo de linhagens de *F. graminearum*, foram encontradas inibições máximas de glicosamina de 74% e de ergosterol de 44%, ficando demonstrado que o principal mecanismo de inibição parece ser dificultar a formação da parede fúngica (glicosamina).

Muitos trabalhos utilizam a medida do halo como uma forma quantitativa de medir o desenvolvimento fúngico (SHUKLA et al 2012; SILVA et al., 2012). Porém, medir também compostos estruturais do fungo, como a glicosamina e o ergosterol propiciam melhores subsídios para o entendimento do mecanismo de ação do extrato natural e, conseqüentemente, para sua melhor aplicação na prevenção da contaminação fúngica em diferentes pontos da cadeia produtiva de alimentos.

Fica demonstrado, nesse trabalho, que o γ -orizanol, além de sua capacidade antioxidante relatada na literatura, tem também um efeito promissor contra o desenvolvimento de *Fusarium*.

3.3 Atividade antimicotoxinas de composto natural (γ -orizanol) e sintéticos (azoxistrobina e trifloxistrobina) contra *F. graminearum* CQ244

Os valores de micotoxinas determinados nos meios com os antifúngicos e no controle encontram-se demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5. Micotoxinas NIV, DON e ZEA.

Princípio ativo	Concentração	Micotoxinas ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
		NIV	DON	ZEA
Azoxistrobina	0,2mg/kg	87,25	78,58	78,59
Trifloxistrobina	0,4mg/kg	89,75	67,51	72,88
Orizanol	0,1 g/kg	81,29	87,14	70,60
Orizanol	0,3 g/kg	91,24	81,47	67,39
Orizanol	0,6 g/kg	97,53	113,22	65,46
Orizanol	0,8 g/kg	61,03	105,66	69,14
Orizanol	1 g/kg	54,88	88,43	70,66
Controle	-	84,59	115,11	70,89

Para a inibição eficaz das três micotoxinas foram necessárias concentrações de γ -orizanol acima de 0,6 g/kg.

Alguns estudos mostraram que o emprego de fungicida sintético acarreta maior contaminação com micotoxinas no grão do que quando a cultura não é submetida a tratamento químico (DORS et al., 2013; HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2012b; HÝSEK, 2005), pois o tratamento químico pode causar maior estresse ao fungo, desencadeando manifestação do seu potencial toxigênico. Neste trabalho ficou demonstrado que houve estímulo da produção de NIV e ZEA quando os fungicidas químicos foram usados. Nesse sentido, a utilização de um composto natural foi mais eficaz para inibir a produção de micotoxinas.

4 CONCLUSÃO

A concentração mínima inibitória (CMI) do γ -orizanol contra *F. graminearum* CQ244 é de 1,2 g/kg.

A produção de glicosamina (parede) no cultivo foi mais inibida pelos antifúngicos (natural e químicos) do que a produção de ergosterol (membrana), sugerindo que eles tem papel importante na redução da eficiência do sistema de proteção da célula fúngica.

A inibição da micotoxina DON ocorreu em todos os casos. Para a inibição eficaz das três micotoxinas estudadas (NIV, DON e ZEA) foram necessárias concentrações de γ -orizanol acima de 0,6 g/kg.

O extrato de γ -orizanol mostrou ser um potencial antifúngico natural, pois além de inibir o fungo, impediu também a manifestação do potencial toxigênico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Consulta Pública nº 77, 2005.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Consulta Pública nº 57, 2003.

ASTOLFI, P.; SANTOS, J.; SPOLTI, P.; TESSMANN D. J.; DEL PONTE E. M. Complexo *Fusarium graminearum*: taxonomia, potencial, potencial toxigênico e genética populacional na era molecular. **Revista Anual de Patologia de Plantas**, v. 18, p. 78-119, 2010.

BARROS, G.; GARCÍA, D.; OVIEDO, S.; RAMIREZ, M.L.; TORRES, A.; CHULZE, S. Deoxynivalenol and nivalenol analysis in soybean and soy flour. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, n. 3, p. 263-266, 2008.

DORS, G. C. **Uso de fungicida no cultivo do arroz irrigado e seus efeitos na composição físico-química, bioquímica e micotoxicológica dos derivados do grão**. 2010. 170 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2010.

DORS, G. C.; CALDAS, S. S.; HACKBART, H. C. S.; PRIMEL, E. G.; FAGUNDES, C. A. A.; BADIALE-FURLONG, E. Fungicides and the Effects of Mycotoxins on Milling Fractions of Irrigated Rice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 1985–1990, 2013.

FERREIRA, C. M.; PINHEIRO, B. S; SOUSA, I. S. F.; MORAIS, O. P. Qualidade do arroz no Brasil: evolução e padronização. **Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão**, p. 61, 2005.

GARP - ASSOCIAÇÃO GRUPO DE ANALISTAS DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS. Manual de resíduos de pesticidas em alimentos, 1999.

GUTAROWSKA, B.; ZAKOWSKA, Z. Mathematical models of mycelium growth and ergosterol synthesis in stationary mould culture. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p. 605–610, 2009.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R. Efeito do emprego de fungicidas no desenvolvimento e manifestação do potencial toxigênico de *Fusarium graminearum* em

arroz. Rio Grande, FURG, 2011. 140 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul. 2011b.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; HACKBART H. C. S.; SOUZA, M. M.; DORS, G.; FAGUNDES, C. A.; BADIALE-FURLONG, E. Determinação de deoxinivalenol e zearalenona em arroz natural e parboilizado e suas frações utilizando QuEChERS e HPLC/UV-FL. **Química Nova**, v. 35, n. 6, 2012b.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; MENDES, G. L.; SCAGLIONI, P. T.; BADIALE-FURLONG E. SOUZA-SOARES, L. A. Biochemistry and metabolism of mycotoxins: A review. **African Journal of Food Science**, v. 5, n. 16, p. 861-869, 2011a.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; NORA, N. S.; BADIALE-FURLONG, E. Extraction of γ -oryzanol from rice bran. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, n. 6, p. 665-673, 2012b.

HOELTZ, M.; WELKE, J. E.; NOLL, I. B.; DOTTORI, H. A. Photometric procedure for quantitative analysis of aflatoxin b1 in peanuts by thin-layer chromatography using charge coupled device detector. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 43-47, 2010.

HÝSEK, J.; VÁŇOVÁ, M.; HAJŠLOVÁ, J.; BROŽOVÁ, J.; SYCHROVÁ, E.; RADOVÁ-SYPECKÁ, Z.; ŠÍP V.; SÝKOROVÁ, S.; CHRPOVÁ, J.; TVARŮŽEK, L. Variation in the production of trichothecene mycotoxin deoxynivalenol (DON) in spring barley varieties after treatment with the fungicides azoxystrobin and tebuconazole. **Plant Protection Science**, v. 41, n. 2, p. 58–62, 2005.

ISMAIL, M.; AL-NAQEEB, G.; MAMAT, W. A. A.; AHMAD, Z. Gamma-oryzanol rich fraction regulates the expression of antioxidant and oxidative stress related genes in stressed rat's liver. **Nutrition and Metabolism**, 2010.

JEONG-YONG, C.; HYOUNG, J. L.; GEE, A. K.; YOU, S. L.; SOO, C. S.; KEUN-HYUNG, P.; JAE-HAK, M. Quantitative analyses of individual γ -oryzanol (Steryl Ferulates) in conventional and organic brown rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Cereal Science**, v. 55, p. 337-343, 2012.

JULIANO, C.; COSSU, M.; ALAMANNI, M. C.; PIU, L. Antioxidant activity of gamma-oryzanol: Mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oils. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 299, p. 146–154, 2005.

KEDIA, A.; PRAKASH, B.; MISHRA, P. K.; DUBEY, N. K. Antifungal and antiaflatoxic properties of *Cuminum cyminum* (L.) seed essential oil and its efficacy as a preservative in stored commodities. *International Journal of Food Microbiology*, p. 168-169, 2014.

KYUNG-EUN, L.; BYUNG, H. K.; CHAN, L. Occurrence of *Fusarium* mycotoxin beauvericin in animal feeds in Korea. **Animal Feed Science and Technology**, v. 157, p. 190–194, 2010.

LERMA-GARCÍA, M.J.; HERRERO-MARTÍNEZ, J.M.; SIMÓ-ALFONSO, E.F.; MENDONÇA, C.R.B.; RAMIS-RAMOS, G. Composition, industrial processing and applications of rice bran γ -oryzanol. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 389-404, 2009.

LUH, B.; BARBERS, S.; BARBER, C. B. **Rice bran: chemistry and technology**. In: LUH, B. S. **Rice: utilization**. 2 ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991.

MARTÍNEZ-ROMERO, D.; SERRANO, M.; BAILÉN, G.; GUILLÉN, F.; ZAPATA, P. J.; VALVERDE, J. M.; CASTILLO, S.; FUENTES, M.; VALERO, D. The use of a natural fungicide as an alternative to preharvest synthetic fungicide treatments to control lettuce deterioration during postharvest storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 47, p. 54–60, 2008.

MONACI, L.; ANGELIS, E.; VISCONTI, A. Determination of deoxynivalenol, T-2 and HT-2 toxins in a bread model food by liquid chromatography–high resolution-Orbitrap-mass spectrometry equipped with a high-energy collision dissociation cell. **Journal of Chromatography A**, n. 1218, n. 48, p. 8646– 8654, 2011.

NGUEFACK, J.; LETH, V.; 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.

NIELSEN, K. F.; SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography–UV–mass spectrometry methodology. **Journal of Chromatography A**, v. 1002, n. 1-2, p. 111–136, 2003.

OLIVEIRA, M. S.; DORS, G. C.; SOUZA-SOARES, L. A.; BADIALE-FURLONG, E. Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, n. 3, p. 267-275, 2007.

PAGNUSSATT, F. A.; KUPSKI, L.; DARLEY, F. T.; FILODA, P. F.; PONTE, E. M.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. *Fusarium graminearum* growth inhibition mechanism using phenolic compounds from *Spirulina* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, p. 75-80, 2013.

PAGNUSSATT, F. A.; DEL PONTE, E. M.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and mycotoxin production by phenolic extract from *Spirulina* sp. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 108, p. 21-26, 2014.

PASCUAL, C. S. C. I.; MASSARETTO, I. L.; KAWASSAKI, F.; BARROS, R. M. C.; NOLDIN, J. A.; MARQUEZ, U. M. L. Effects of parboiling, storage and cooking on the levels of tocopherols, tocotrienols and γ -oryzanol in brown rice (*Oryza sativa* L.). **Food Research International**, v. 50, n. 2, p. 676-681, 2013.

RASOOLI, I.; ABYANEH, M. R. Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Food Control**, v. 15, n. 6, p. 479-483, 2004.

REYES-DOMINGUEZ, Y.; BOEDI, S.; SULYOK, M.; WIESENBERGER, G.; STOPPACHER, N.; KRŠKA, R.; STRAUSS, J. Heterochromatin influences the secondary metabolite profile in the plant pathogen *Fusarium graminearum*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, p. 39-47, 2012.

SHUKLA, R.; SINGH, P.; PRAKASH, B.; DUBEY, N. K. Antifungal, aflatoxin inhibition and antioxidant activity of *Callistemon lanceolatus* (Sm.) Sweet essential oil and its major component 1,8-cineole against fungal isolates from chickpea seeds. **Food Control**, v. 25, p. 27-33, 2012.

SILVA, J. L.; TEIXEIRA, R. N. V.; SANTOS, D. I. V.; PESSOA, J. O.; Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o crescimento in vitro de fitopatógenos. **Revista Verde**, v. 7, n. 1, p. 80-86, 2012.

SOSPEDRA, I.; BLESÁ, J.; SORIANO, J. M.; MAÑÉS, J. Use of the modified quick easy cheap effective rugged and safe sample preparation approach for the simultaneous analysis of type A- and B-trichothecenes in wheat flour. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 1437-1440, 2010.

SOUZA, M. M.; OLIVEIRA, M. S.; ROCHA, M.; FURLONG, E. B. Avaliação da atividade antifúngica de extratos fenólicos de cebola, farelo de arroz e microalga *Chlorella phyrenoidos*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 680-685, 2010.

SOUZA, M. M.; PRIETTO, L.; RIBEIRO, A. C.; SOUZA, T. D.; BADIALE-FURLONG, E. Assessment of the antifungal activity of *Spirulina platensis* phenolic extract against *Aspergillus flavus*. **Ciência e Agrotecnologia de Lavras**, v. 35, n. 6, p. 1050-1058, 2011.

VACLAVIK, L.; ZACHARIASOVA, M.; HRBEK, V.; HAJŠLOVA, J. Analysis of multiple mycotoxins in cereals under ambient conditions using direct analysis in real time (DART) ionization coupled to high resolution mass spectrometry. **Talanta**, v. 82, p 1950-1957, 2010.

YAMAMOTO-RIBEIRO, M. M. G.; GRESPAN, R.; KOHIYAMA, C. Y.; FERREIRA, F. D.; MOSSINI, S. A. G.; SILVA, E. L.; FILHO, B. A. A.; MIKCHA, J. M. G.; JUNIOR, M. M. Effect of *Zingiber officinale* essential oil on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production. **Food Chemistry**, v.141, p. 3147-3152, 2013.

ZACHARIASOVA, M.; LACINA, O.; MALACHOVA, A.; KOSTELANSKA, M.; POUSTKA, J.; GODULA, M.; HAJŠLOVA, J. Novel approaches in analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals employing ultra performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 662, n. 1, p. 51–61, 2010.

ARTIGO 4

COMPLEXO *Fusarium graminearum*: INIBIÇÃO DO DESENVOLVIMENTO, DA PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS E DA EXPRESSÃO GÊNICA POR COMPOSTOS NATURAIS E SINTÉTICOS

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo verificar a inibição do crescimento e do potencial toxigênico de linhagens do Complexo *F. graminearum* usando antifúngicos naturais (γ -orizanol, ácidos fenólicos de sementes de nim (EFN) e ácidos fenólicos de farelo de arroz (EFF)) ao longo de 30 dias, bem como verificar se havia modificação de expressão gênica das linhagens em presença dos extratos antifúngicos. Os fungicidas azoxistrobina e trifloxistrobina foram usados para fins de comparação. Os indicativos de desenvolvimento fúngico foram avaliados no 3°, 7°, 14°, 24°, 30° dias através da determinação de compostos estruturais da parede (glicosamina) e da membrana fúngica (ergosterol) e da atividade das enzimas α -amilase e proteases. Também foi avaliado o crescimento radial das colônias. As micotoxinas DON, 15AcDON, 3AcDON, NIV e ZEA foram extraídas dos meios usando método QuEChERS e quantificadas usando HPLC-UV/FL. A expressão dos genes *Tri1* e *Tri5* foi determinada por qPCR a fim de verificar a modificação na expressão das linhagens do Complexo *F. graminearum* ocasionada pela presença dos antifúngicos. Os compostos utilizados, naturais e sintéticos, promoveram a diminuição da atividade das enzimas hidrolíticas do microorganismo. As inibições médias de α -amilase variaram entre 59% pelo γ -orizanol a 13% pelo azoxistrobina e de protease entre 56% pelo γ -orizanol a 28% pelo EFF. Os extratos fenólicos são mais eficientes e eficazes para inibição do *F. graminearum* do que o γ -orizanol. Além disso, os extratos naturais se destacam pela capacidade de inibição de micotoxinas produzidas pela biomassa fúngica, com destaque para o extrato fenólico do nim. Há relação direta entre a expressão do gene *Tri5* e a produção de DON nas linhagens submetidas aos tratamentos com antifúngicos.

Palavras-chave: γ -orizanol, ácidos fenólicos, farelo de arroz, sementes de nim, glicosamina, ergosterol.

1 INTRODUÇÃO

A contaminação fúngica é um problema durante a produção de alimentos. Algumas espécies representam um risco maior por sua capacidade de produzir metabólitos secundários tóxicos que causam danos para humanos e animais de criação, nem sempre facilmente relacionado com o consumo deles através da dieta (HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2011; TIAN et al., 2012).

De acordo com a FAO (*Food and Agriculture Organization*), 25% das lavouras de alimentos do mundo são afetadas por micotoxinas e 10% dos produtos alimentícios agrícolas são degradados por fungos.

As espécies de fungos micotoxigênicos envolvidos na cadeia alimentar humana pertencem, com mais frequência, aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (SWEENEY; DOBSON, 1998). Fungos filamentosos tais como *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* crescem naturalmente em frutas e grãos ou sobre resíduos agrícolas lignocelulósicos e amiláceos (NIGAM; SINGH, 1994).

As toxinas de *Fusarium* mais frequentes encontradas em alimentos de consumo rotineiro cujos limites estão estabelecidos por muitos países são: zearalenona, deoxinivalenol, nivalenol, toxina T-2, 3 acetildeoxinivalenol, 15 acetildeoxinivalenol e fumonisina (CARVALHO, 2005).

Quando produtos alimentícios e especiarias são contaminados por micotoxinas é quase impossível detoxificar utilizando processos usuais da indústria de alimentos ou durante o preparo doméstico. Por isso, controlar o crescimento do fungo e a produção de toxinas é uma demanda para garantir a segurança alimentar. Os agrotóxicos são rotineiramente utilizados como estratégia para proteger as plantas de doenças provocadas por contaminação fúngica (PEREIRA, 2009). No entanto, eles estão associados a efeitos adversos ao sistema nervoso central e periférico, têm ação imunodepressora e são cancerígenos (ECOBICHON, 1993).

Compostos extraídos de fontes naturais com propriedades antifúngicas vêm sendo bastante estudados como uma alternativa em substituição aos fungicidas sintéticos e dentre os mais estudados estão os compostos fenólicos de diferentes fontes que tem se mostrado promissores no combate a contaminação fúngica (PAGNUSSATT et al., 2014; SOUZA et al., 2012).

Neste trabalho, o objetivo foi verificar a inibição de linhagens do Complexo *Fusarium graminearum* e da manifestação do seu potencial toxigênico por extratos de farelo de arroz (γ -orizanol e ácidos fenólicos) e sementes de nim (ácidos fenólicos), bem como verificar a possível alteração na expressão gênica das linhagens em presença dos extratos antifúngicos. Os fungicidas azoxistrobina e trifloxistrobina foram usados para fins de comparação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matérias-primas utilizadas para extração dos compostos naturais

O farelo de arroz, usado para extração do γ -orizanol e de ácidos fenólicos, foi cedido por empresa da região Sul do Rio Grande do Sul e armazenado à -18°C . Antes do uso, o farelo foi homogeneizado e separada a fração de granulometria 35 mesh.

As sementes de nim, usadas para extração de ácidos fenólicos, foram cedidas por empresa da região Mogiana de São Paulo e armazenadas à 4°C . As sementes foram moídas e separada a fração de granulometria 24 mesh.

2.2 Linhagens do Complexo *Fusarium graminearum*

Os fungos usados neste trabalho foram cedidos pelo laboratório de Epidemiologia de Plantas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e foram isolados das plantas de trigo, arroz e cevada (Tabela 1).

Tabela 1. Linhagens de *F. graminearum* analisadas neste trabalho.

Linhagem	Código	Filogeografia*	Origem	Micotoxina**
<i>Fusarium graminearum</i>	08Tr031	Cosmopolita	Trigo	15AcDON
<i>Fusarium asiaticum</i>	09Ar004	Ásia	Arroz	NIV
<i>Fusarium meridionale</i>	07Cv001	América do Sul, África, Ásia	Cevada	NIV

*Distribuição global das endemias causadas pelo fungo (ASTOLFI et al., 2010).

**Quimiotipo determinado através de ensaios de PCR convencional (ASTOLFI et al., 2011).

Os fungos foram identificados com base em observações das estruturas do micélio e esporos em microscópio comparando com a literatura e pela quimiotaxonomia de cada linhagem (ASTOLFI et al., 2010, 2011).

A cultura foi mantida em meio *Spezieller Nährstoffarmer Agar* (SNA) à 4°C . Para realização do experimento, o fungo foi repicado para *Batata Dextrose Agar* (BDA) e incubado por 7 dias à 25°C em estufa BOD (12 h claro/12 h escuro).

2.3 Obtenção dos antifúngicos

O γ -orizanol foi extraído do farelo de arroz conforme Heidtmann-Bemvenuti et al., (2012), resultando num extrato oleoso de coloração amarelada.

Os extratos fenólicos do farelo de arroz (EFF) e das sementes de nim (EFN) foram preparados segundo descrito por Souza et al., (2011). A quantificação foi realizada usando a redução do Folin Ciocalteau cuja intensidade da absorvância (750 nm) foi empregada para a estimativa de ácido gálico a partir de uma curva padrão cujas concentrações variaram de 2 a 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados foram expressos em equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de amostra (FURLONG et al., 2003; SOUZA et al., 2011).

Os extratos oleoso (AZA oleosa) (NATHAN et al., 2007) e aquoso (AZA aquosa) (FORIM et al., 2010) das sementes de nim foram obtidos e quantificados por curva padrão de azadiractina. Foi preparada uma solução trabalho de azadiractina pela dissolução do padrão (5 mg; Sigma-Aldrich; CAS 11141-17-6; pureza de 95%) em 10 mL de metanol. A curva padrão de foi construída nas concentrações de 0,03, 0,05, 0,1, 0,15 e 0,2 mg/mL, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro UV-Vis (modelo Cary 100-Varian) à 205 nm (LÓPEZ-PANTOJA et al., 2007).

Os antifúngicos sintéticos (azoxistrobina e trifloxistrobina) foram preparados a partir de padrões diluídos em água (0,04 mg mL⁻¹), sendo esse valor baseado nos limites máximos permitidos pela legislação brasileira em cultura de arroz (ANVISA, 2005; ANVISA 2003). Os níveis adicionados dos fungicidas sintéticos foram de 0,2 mg kg⁻¹ e 0,4 mg kg⁻¹, respectivamente.

2.4 Testes prévios da concentração dos compostos naturais contra *Fusarium*

Foram testadas diferentes concentrações dos antifúngicos naturais (γ -orizanol, EFF, EFN, AZA aquosa e AZA oleosa) para verificar o efeito sobre *F. graminearum*. Em placas de Petri de 8 cm de diâmetro foram adicionados 15 mL de BDA e volumes de antifúngicos de concentrações conhecidas. Após homogeneização e formação de gel no meio, um disco de micélio foi colocado ao centro da placa para avaliar o desenvolvimento da hifa comparando com o meio controle (sem antifúngicos) durante 72 horas. Após esse período, não era mais possível a medição do halo das placas contendo azadiractina devido a alta contaminação, por isso as medições foram realizadas no tempo de 72 horas.

As concentrações testadas foram: 0,1; 0,3; 0,6; 0,8, 1,0 e 1,2 g/kg de γ -orizanol; 0,025, 0,035, 0,050, 0,075 e 0,100 g/kg de extrato fenólico de farelo de arroz; 0,025, 0,035, 0,050, 0,075 e 0,100 g/kg de extrato fenólico de sementes de nim; 0,1, 0,3, 0,6, 0,8, 1,0 e 1,2 g/kg de azadiractina aquosa e 0,3, 0,6, 0,8, 1,0 e 1,2 g/kg de azadiractina oleosa.

A Concentração Média Inibitória (MIC_{50}), foi calculada como sendo a concentração na qual se observava 50% de inibição da formação das hifas em relação ao controle.

2.5 Inibição de linhagens do Complexo *F. graminearum* e da manifestação do seu potencial toxigênico por extratos naturais

O método de diluição em ágar foi usado empregando placas de Petri de 8 cm de diâmetro onde foram adicionados o meio BDA e os extratos, de forma a perfazer uma concentração final estabelecida com base nos testes preliminares do item 2.4 (de 0,9 g kg⁻¹ para o γ -orizanol; 0,032 g kg⁻¹ para os extratos fenólicos; 0,2 mg kg⁻¹ para o azoxistrobina e 0,4 mg kg⁻¹ para trifloxistrobina). O meio controle não continha antifúngico. A azadiractina não foi usada nesta etapa, pois não mostrou ação antifúngica satisfatória nos testes preliminares contra *Fusarium graminearum* (item 2.4), além da contaminação que causou na cultura após 72 horas de cultivo.

Discos de micélio (0,5 cm) das três linhagens do Complexo *Fusarium graminearum* (08Tr031, 09Ar004 e 07Cv001) foram adicionados às placas. As culturas foram incubadas em estufa BOD a 25°C (12 h claro/12h escuro) durante trinta dias. Amostras foram retiradas nos intervalos 3°, 7°, 14°, 24° e 30° dias para acompanhamento do desenvolvimento fúngico.

O potencial antifúngico dos extratos foi avaliado pela determinação de compostos estruturais do fungo: glicosamina (parede) e ergosterol (membrana), e da atividade das enzimas α -amilase e proteases (ANEXO 4). Também foi avaliado o crescimento radial das colônias (GUTAROWSKA; ZAKOWSKA, 2009; PAGNUSSATT et al., 2013; SOUZA et al., 2011).

As micotoxinas deoxinivalenol (DON), 15 acetildeoxinivalenol (15AcDON), 3 acetildeoxinivalenol (3AcDON), nivalenol (NIV) e zearalenona (ZEA) foram extraídas do meio usando método QuEChERS modificado (VACLAVICK et al., 2010) (ANEXO 5) e quantificadas usando HPLC/UV-FL. O método utilizado foi baseado no desenvolvido por SEUS, (2014), que determinou os tricotecenos DON, 15AcDON,

3AcDON e NIV, porém foi acrescentada a zearalenona ao método. A coluna utilizada foi Genini 5 μ C18 (250 x 4,6 mm). A fase móvel foi acetonitrila:água (70:30), vazão 0,5 mL/min, temperatura do forno 40°C, comprimentos de onda de 220 nm para o detector ultravioleta, que determinou os tricotecenos, e de 350 nm (excitação) e 450 nm (emissão) para o detector de fluorescência, que determinou a zearalenona. O tempo total de eluição foi de 15 min.

2.6 Expressão dos genes envolvidos na síntese dos tricotecenos

A expressão dos genes *Tri1* e *Tri5*, os quais estão envolvidos na síntese de tricotecenos em *F. graminearum*, foi determinada no Laboratório de Fungos Toxigênicos e Micotoxinas da Universidade de São Paulo (USP) através da técnica Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR), com o objetivo de verificar se havia modificação de expressão gênica das linhagens do Complexo *F. graminearum* em presença dos extratos antifúngicos (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Essa análise foi realizada no 14º dia de desenvolvimento do fungo, coincidindo com a fase log de crescimento (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

2.6.1 Cultivo e isolamento de RNA

O micélio fúngico foi retirado, adicionado nitrogênio líquido e moido. O RNA total foi extraído utilizando o *Kit RNeasy* (Qiagen), de acordo com o manual de instruções. Em seguida, o cDNA foi sintetizado utilizando o *Kit Sensiscript RT* (Qiagen). Cada 20 μ L de reação possui 10 μ L do produto de extração de RNA total, 2 μ L de *Random primers* (3 μ g/ μ L- *Invitrogen*), 2 μ L de 10X RT-PCR *buffer*, 2 μ L de dNTP *mix*, 1 μ L de inibidor de RNase (40 U/ μ L - *Invitrogen*), 1 μ L de *Sensiscript Reverse Transcriptase* e 2 μ L de água DEPEC. A síntese do cDNA foi realizada no *Step One Plus Real – Time PCR Systems (Applied Biosystems)* por 1 h a 37°C. As amostras foram mantidas a -20 °C.

2.6.2 Teste de eficiência dos iniciadores

As condições para a termociclagem foram: 50°C (2 minutos), 95°C (2 minutos), 40 ciclos a 95°C (15 segundos) e 60°C por (30 segundos). O reagente *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix - UDG* (*Invitrogen*) foi utilizado na reação, adicionando 3 μ L de água MilliQ estéril, 4 μ L de iniciador e 5 μ L de cDNA, 12,5 μ L do reagente *Sybr* e 0,5 μ L de ROX, totalizando 25 μ L. Os iniciadores foram analisados em duplicata no

equipamento *Step One Plus Real – Time PCR Systems (Applied Biosystems)*. Foram testados os genes de referência: fator de alongação 1 α , calmodulina e β -tubulina. A quantificação relativa do cDNA foi baseada no método DDCT. Os valores de DDCT foram transformados em log2 para gerar os níveis de expressão relativa (GIZINGER, 2002).

Para a validação do método, foram feitas diluições seriadas em triplicata com 6 pontos do gene alvo e do gene de referência. A partir da curva gerada pelo *software*, foram calculadas as eficiências dos ensaios através da fórmula: $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$ para cada gene. Em seguida, foi verificada a compatibilidade das eficiências geradas para os ensaios do gene alvo e dos genes de referência.

2.6.3 Análise das amostras

Com as eficiências dos iniciadores dentro do estabelecido ($E = 90-110\%$), o RNA das amostras foi extraído, quantificado e transformado em cDNA para ser analisado. Em todas as corridas também foi realizado a curva de "melting" para confirmar a detecção exclusiva do fragmento de interesse.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Testes prévios da concentração dos compostos naturais contra *Fusarium*

Das sementes de nim, foram obtidos 0,107 g AZA/g no extrato aquoso e 0,07 g AZA/g no extrato oleoso, sendo o rendimento de 20 mL e 3 mL para cada 10 g de sementes, respectivamente. O extrato de azadiractina (AZA) não foi usado no estudo do efeito antimicotoxigênico, pois nos testes preliminares ela mostrou ser pouco eficaz contra *Fusarium*, pois inibiu o desenvolvimento fúngico apenas até 72 horas de cultivo e, após esse período, os meios de cultivo ficavam contaminados com outros fungos, principalmente os tratados com extrato oleoso.

As Concentrações Médias Inibitórias (MIC_{50}), que correspondem a concentração na qual ocorre 50% de inibição em relação ao controle, estão mostradas na Tabela 2 para os cultivos de 72 horas. A escolha da concentração do princípio ativo que foi empregada para os experimentos do potencial antimicotoxigênico contra *Fusarium*, que foram 0,9 g/kg e 0,032 g/kg para o γ -orizanol e ácidos fenólicos (de sementes de nim e de farelo de arroz), respectivamente, foi baseada na MIC_{50} . A Tabela 2 mostra as

inibições verificadas nos testes preliminares após 72 horas de desenvolvimento do fungo comparando com o controle.

Não foi possível calcular a MIC₅₀ da AZA aquosa, pois os efeitos inibitórios observados variaram de forma aleatória em relação ao aumento das concentrações empregadas nos experimentos. Este fato pode estar associado à presença de compostos que possuem tanto atividade antagônica sobre os patógenos, como também compostos que estimulam o crescimento dos patógenos, pois numa solução aquosa são muitas as famílias químicas que podem ser solubilizadas.

Tabela 2. Inibições verificadas nos testes prévios de diferentes concentrações de compostos naturais contra *Fusarium*.

Fonte do composto natural	Composto natural	Concentração (g/kg)	*Inibição (%)	**MIC ₅₀	Concentração escolhida***	
Farelo de arroz	γ-orizanol	0,1	0±0	0,9	0,9 g/kg	
		0,3	11,9±0,5			
		0,6	17,7±0,7			
		0,8	37,1±0,8			
		1,0	52,6±0,5			
		1,2	100±0			
	Extrato Fenólico do Farelo	0,025	48,7±0,3	0,032	0,032 g/kg	
		0,035	51,0±0,2			
		0,050	100±0			
		0,075	100±0			
Sementes de nim	Extrato Fenólico do Nim	0,1	100±0	0,037	0,032 g/kg	
		0,025	29,0±0,2			
		0,035	37,9±0,2			
		0,050	100±0			
		0,075	100±0			
	AZA aquosa	AZA aquosa	0,1	11,1±0,9	NC	Não foi testado.
			0,3	12,7±1,1		
			0,6	11,7±0,9		
			0,8	23,0±0,9		
			1,0	14,9±1,0		
1,2			15,5±0,8			
AZA oleosa		AZA oleosa	0,3	17,4±0,8	1,2	Não foi testado.
			0,6	23,9±0,9		
			0,8	33,0±1,1		
			1,0	38,0±1,0		
	1,2		49,7±0,9			

AZA aquosa = fração aquosa da azadiractina; AZA oleosa = fração oleosa da azadiractina; NC = não foi possível calcular. *Valores demonstrados como média±erro padrão (n=3); **concentração média inibitória; ***concentração do extrato escolhida para realização dos experimentos posteriores (antifúngicos/antimicotoxinas).

3.2 Inibição de linhagens do Complexo *F. graminearum* e da manifestação do seu potencial toxigênico por extratos naturais

As Tabelas 3, 4 e 5 mostram a inibição fúngica pelos extratos utilizados, considerando os indicativos formação de halo, teores de glicosamina e de ergosterol, respectivamente.

O destaque em capacidade inibitória foi para o γ -orizanol, que se mostrou capaz de reduzir a formação do halo, e os constituintes da parede e da membrana celular. Além disso, foram inibidas as enzimas fúngicas que promovem a obtenção de nutrientes do meio. Os extratos fenólicos, tanto de sementes de nim como de farelo de arroz, tiveram uma atuação similar, nos quais foi observada uma inibição mais expressiva das enzimas em relação à observada para os compostos estruturais. É importante lembrar que o γ -orizanol foi o extrato com maior concentração no meio, e quando verificada a MIC₅₀ dos compostos naturais (0,9 g/kg para γ -orizanol; 0,032 g/kg para EFF e 0,037 g/kg para EFN) observa-se que os extratos fenólicos são mais eficientes e eficazes para inibição do *F. graminearum*.

Os compostos sintéticos (azoxistrobina e trifloxistrobina) apresentaram valores de inibição não consistentes, demonstrados por variações aleatórias dos indicativos de inibição, durante os 30 dias de acompanhamento, em que foram observados, inclusive, valores negativos principalmente após o 14º dia. Isso justifica a recomendação de reaplicação desse produto pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), que recomenda a reaplicação de azoxistrobina e trifloxistrobina após 30 e 15 dias, respectivamente, na cultura de arroz (ANVISA, 2003; ANVISA, 2005). Porém, esses compostos são tóxicos aos seres vivos, mesmo em baixas concentrações (FARIA et al., 2007). Ao contrário dos extratos naturais, que se mostraram eficazes para a inibição fúngica e poderiam ser reaplicados mais vezes durante o desenvolvimento da cultura no campo.

Tabela 3. Faixa de inibição indicada pela medida do halo do 3° ao 30° dia (%).

Antifúngico	<i>F. graminearum</i>	<i>F. asiaticum</i>	<i>F. meridionale</i>
	08Tr031	09Ar004	07Cv001
Azoxistrobina (0,2 mg kg ⁻¹)	0 - 7,8	0 - 3,3	0 - 36,7
Trifloxistrobina (0,4 mg kg ⁻¹)	0 - 13,2	0 - 6,6	0 - 49,4
γ-orizanol (0,9 g kg ⁻¹)	28,3 - 47,73	22,5 - 29,1	0 - 62,5
EF sementes de nim (32 mg kg ⁻¹)	37,5 - 63,1	34,9 - 59,8	37,1 - 74,0
EF farelo de arroz (32 mg kg ⁻¹)	29,3 - 58,7	38,2 - 59,8	42,8 - 71,7

Tabela 4. Inibição fúngica indicada pela produção de glicosamina (%).

Tempo (dia)	<i>F. graminearum</i> 08Tr031				
	AZO (0,2 mg kg ⁻¹)	TRI (0,4 mg kg ⁻¹)	ORI (0,9 g kg ⁻¹)	EFN (32 mg kg ⁻¹)	EFF (32 mg kg ⁻¹)
3	15,1 ^{ABb}	18,5 ^{ABb}	73,2 ^{ABa}	28,7 ^{Ab}	24,5 ^{Ab}
7	1,6 ^{BCb}	7,0 ^{BCb}	62,4 ^{ABa}	9,9 ^{ABb}	40,1 ^{Aa}
14	26,3 ^{Ab}	42,5 ^{Ab}	80,2 ^{Aa}	3,9 ^{Bc}	3,4 ^{Ac}
24	-13,2 ^{CDbc}	-15,6 ^{Cc}	42,2 ^{Ca}	11,7 ^{ABb}	3,0 ^{Abc}
30	-17,9 ^{Dc}	-11,3 ^{Cc}	55,3 ^{BCa}	4,9 ^{Bbc}	21,6 ^{Ab}
<i>F. asiaticum</i> 09Ar004					
3	1,8 ^{Ab}	5,8 ^{Ab}	81,2 ^{Aa}	4,4 ^{Ab}	6,9 ^{Bb}
7	2,7 ^{Ab}	-6,4 ^{Ab}	72,9 ^{Aa}	2,8 ^{Ab}	6,7 ^{Bb}
14	9,6 ^{Ab}	-13,6 ^{Ab}	64,9 ^{Aa}	14,8 ^{Ab}	14,2 ^{Bb}
24	-76,9 ^{Be}	-61,5 ^{Bd}	85,5 ^{Aa}	8,9 ^{Ac}	34,7 ^{Ab}
30	-4,5 ^{Ac}	-17,4 ^{ABc}	58,1 ^{Aa}	11,4 ^{Abc}	33,3 ^{Aab}
<i>F. meridionale</i> 07Cv001					
3	6,7 ^{Ab}	14,2 ^{Ab}	63,5 ^{ABa}	15,7 ^{Ab}	19,7 ^{Ab}
7	5,0 ^{Abc}	-23,0 ^{Ac}	60,6 ^{Ba}	13,8 ^{Abc}	28,7 ^{Aab}
14	6,9 ^{Ab}	-2,3 ^{Ab}	82,1 ^{Aa}	1,7 ^{Ab}	7,2 ^{Ab}
24	-27,2 ^{Ac}	-21,3 ^{Ac}	64,7 ^{ABa}	4,9 ^{Abc}	15,5 ^{Ab}
30	-10,8 ^{Ab}	-1,25 ^{Ab}	70,6 ^{ABa}	0,8 ^{Ab}	10,0 ^{Ab}

Valores expressos como média; letras maiúsculas diferentes quando há diferença significativa na coluna; letras minúsculas diferentes quando há diferença significativa na linha (Tukey HSD, $p < 0,05$). AZO=azoxistrobina; TRI=trifloxistrobina; ORI=γ-orizanol; EFN=extrato fenólico do nim; EFF=extrato fenólico do farelo de arroz.

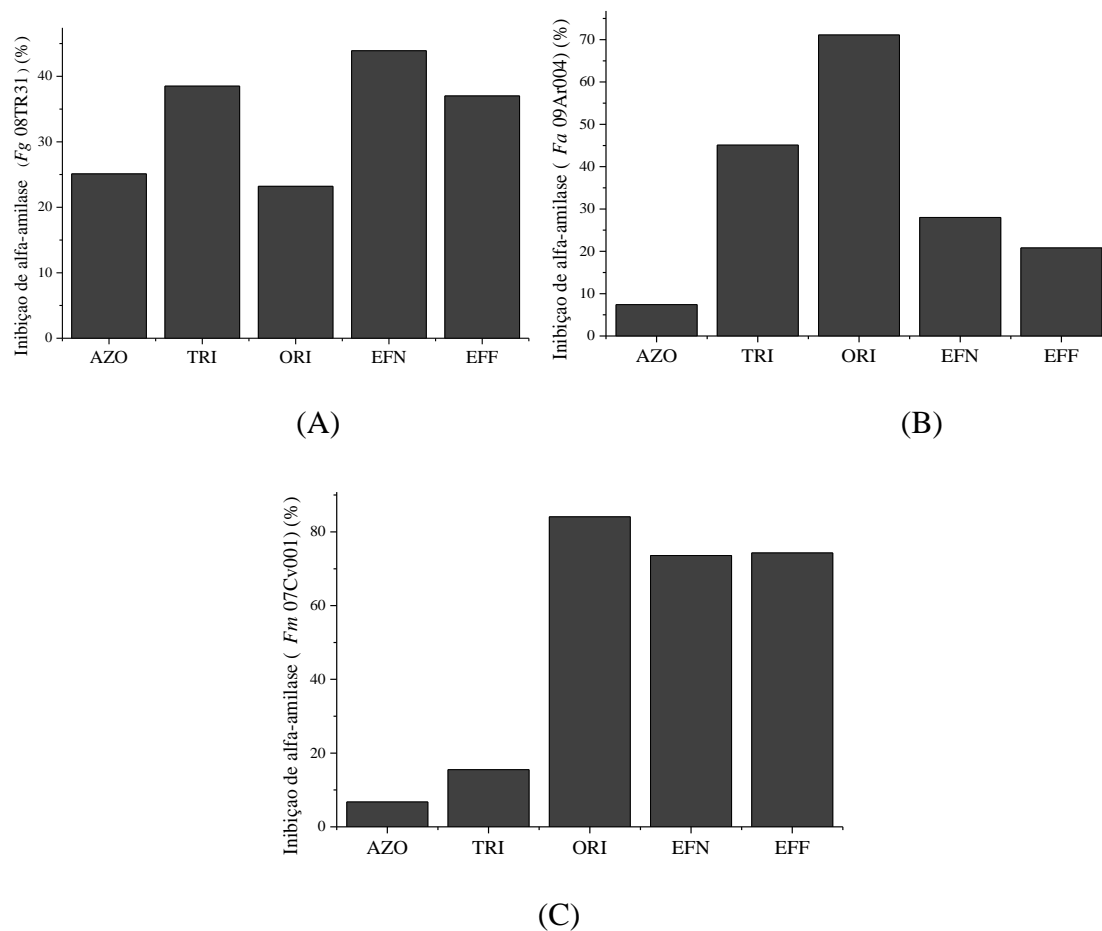
Tabela 5. Inibição fúngica indicada pela produção de ergosterol (%).

<i>F. graminearum</i> 08Tr031					
Tempo (dia)	AZO (0,2 mg kg ⁻¹)	TRI (0,4 mg kg ⁻¹)	ORI (0,9 g kg ⁻¹)	EFN (32 mg kg ⁻¹)	EFF (32 mg kg ⁻¹)
3	-16,1 ^{ABb}	6,3 ^{Ab}	58,9 ^{ABa}	40,9 ^{Aa}	36,9 ^{ABa}
7	15,8 ^{Ab}	9,4 ^{Ab}	61,3 ^{Aa}	9,9 ^{BCb}	9,3 ^{Cb}
14	1,5 ^{Ac}	-15,4 ^{ABc}	65,3 ^{Aa}	2,4 ^{Cc}	30,6 ^{BCb}
24	-10,9 ^{ABc}	-13,0 ^{Ac}	56,4 ^{ABa}	19,7 ^{Bb}	52,3 ^{ABa}
30	-44,3 ^{Bb}	-47,6 ^{Bb}	41,7 ^{Ba}	38,1 ^{Aa}	56,8 ^{Aa}
<i>F. asiaticum</i> 09Ar004					
3	-27,2 ^{Bd}	-23,8 ^{Bcd}	43,3 ^{ABa}	7,1 ^{Cbc}	17,9 ^{Bab}
7	36,1 ^{Aa}	35,2 ^{Aa}	59,3 ^{Aa}	0,9 ^{Cb}	8,6 ^{Cb}
14	14,4 ^{Aab}	-13,7 ^{Bb}	31,0 ^{Ba}	22,9 ^{Ba}	4,2 ^{Cab}
24	18,4 ^{Ac}	36,5 ^{Abc}	58,4 ^{Aa}	56,3 ^{Aab}	32,4 ^{Ac}
30	7,3 ^{ABc}	-22,2 ^{Bd}	48,1 ^{ABa}	27,1 ^{Bb}	26,6 ^{Ab}
<i>F. meridionale</i> 07Cv001					
3	-2,67 ^{ABb}	-36,1 ^{Cc}	2,8 ^{Aab}	1,1 ^{Eab}	33,6 ^{Ca}
7	28,7 ^{Aa}	5,1 ^{Bb}	25,3 ^{Aa}	28,6 ^{Ba}	21,0 ^{Da}
14	35,7 ^{Aa}	22,4 ^{ABab}	20,9 ^{Aab}	23,0 ^{Cab}	3,9 ^{Eb}
24	-17,8 ^{Bbc}	-53,5 ^{Cc}	11,8 ^{Aab}	42,4 ^{Aa}	43,8 ^{Aa}
30	20,5 ^{ABbc}	47,0 ^{Aa}	7,9 ^{Ad}	13,7 ^{Dc}	37,9 ^{Bab}

Valores expressos como média; letras maiúsculas diferentes quando há diferença significativa na coluna; letras minúsculas diferentes quando há diferença significativa na linha (Tukey HSD, $p < 0,05$). AZO=azoxistrobina; TRI=trifloxistrobina; ORI= γ -orizanol; EFN=extrato fenólico do nim; EFF=extrato fenólico do farelo de arroz.

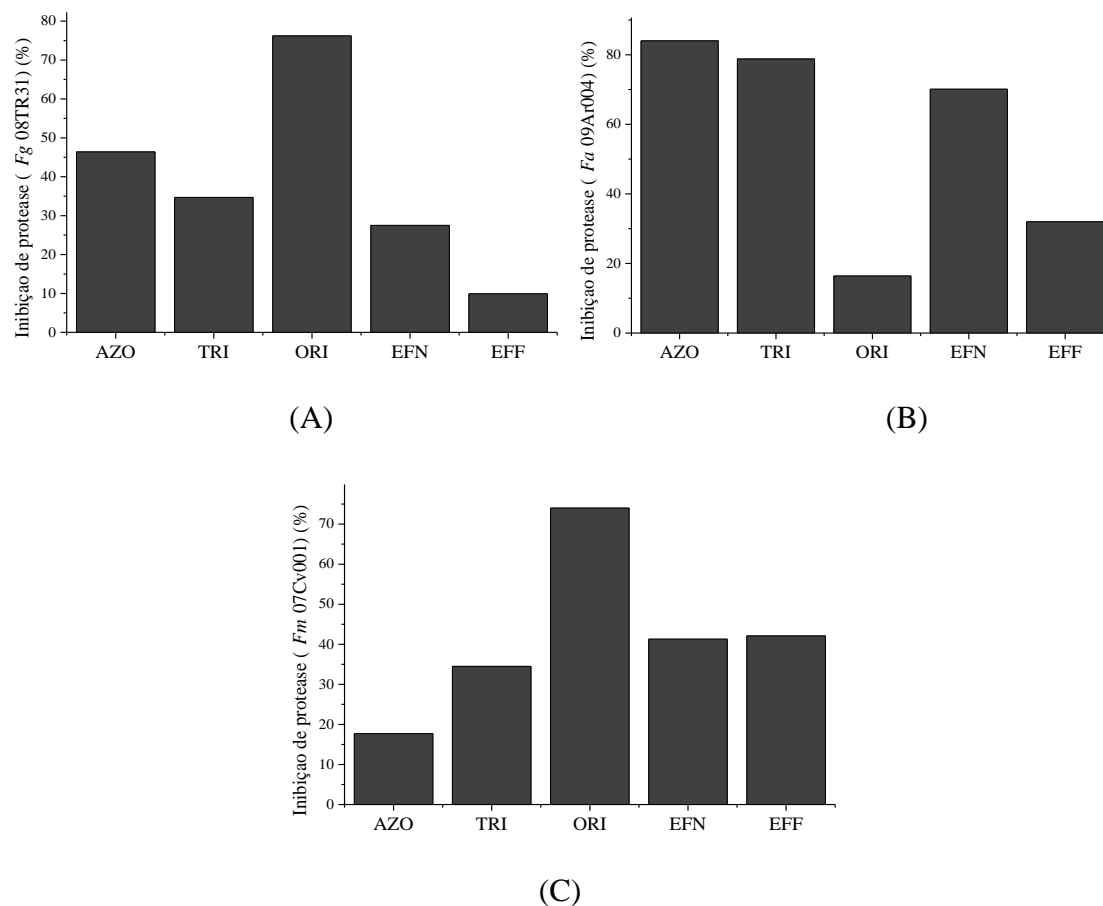
As Figuras 1 e 2 mostram a inibição das atividades de α -amilase e proteases, proporcionada pelos antifúngicos no 14º dia de desenvolvimento do fungo, coincidindo com a fase log de crescimento (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Figura 1. Inibição (%) da atividade da α -amilase do *F. graminearum* (08Tr031) (A), *F. asiaticum* (09Ar004) (B), *F. meridionale* (07Cv001) (C) pelos antifúngicos.



AZO=azoxistrobina; TRI=trifloxistrobina; ORI= γ -orizanol; EFN=extrato fenólico do nim; EFF=extrato fenólico do farelo de arroz.

Figura 2. Inibição (%) da atividade de proteases do *F. graminearum* (08Tr031) (A), *F. asiaticum* (09Ar004) (B), *F. meridionale* (07Cv001) (C) pelos antifúngicos.



AZO=azoxistrobina; TRI=trifloxistrobina; ORI= γ -orizanol; EFN=extrato fenólico do nim; EFF=extrato fenólico do farelo de arroz.

Neste trabalho, verificamos que os extratos naturais afetaram as atividades das enzimas α -amilase e proteases. Também ocorreu a redução da formação de componentes estruturais, possivelmente como consequência da diminuição do aporte de nutrientes do meio. Estas constatações contribuem para a elucidação do mecanismo de ação dos antifúngicos naturais estudados.

Todos os compostos utilizados, naturais e sintéticos, parecem afetar principalmente as atividades das enzimas do metabolismo primário dos fungos (Quadro 1).

Quadro 1. Resumo do efeito dos extratos sobre os indicativos de desenvolvimento fúngico.

Medida	Composto				
	AZO (0,2 mg kg ⁻¹)	TRI (0,4 mg kg ⁻¹)	ORI (0,9 g kg ⁻¹)	EFN (32 mg kg ⁻¹)	EFF (32 mg kg ⁻¹)
Glicosamina	Valores não consistentes, apresentando grandes variações, inclusive com inibições negativas.	Valores não consistentes, apresentando grandes variações, inclusive com inibições negativas.	Inibição máxima de 85,5%	Inibição máxima de 28,7%	Inibição máxima de 40,1%
Ergosterol	Valores não consistentes, apresentando grandes variações, inclusive com inibições negativas.	Valores não consistentes, apresentando grandes variações, inclusive com inibições negativas.	Inibição máxima de 65,3%	Inibição máxima de 56,3%	Inibição máxima de 56,8%
Enzimas (α -amilase e protease)	Inibe ambas, com destaque para a protease, com inibição máxima de 84%.	Inibe ambas, com destaque para a protease, com inibição máxima de 78,8%.	Inibição máxima de 84,1% para α -amilase e 76,2% para protease.	Inibição máxima de 73,5% para α -amilase e 70,1% para protease.	Inibição máxima de 74,3% para α -amilase e 42,1% para protease.

AZO=azoxistrobina; TRI=trifloxistrobina; ORI= γ -orizanol; EFN=extrato fenólico do nim; EFF=extrato fenólico do farelo de arroz.

De acordo com Daglia, (2012), os compostos fenólicos, em especial, os derivados do ácido cinâmico, os ácidos cumárico, caféico e ferúlico, são potentes antioxidantes e atuam como inibidores de enzimas fúngicas. No presente estudo, todos os extratos eram compostos fenólicos e atuaram inibindo a catálise enzimática ou promoveram a sua inativação.

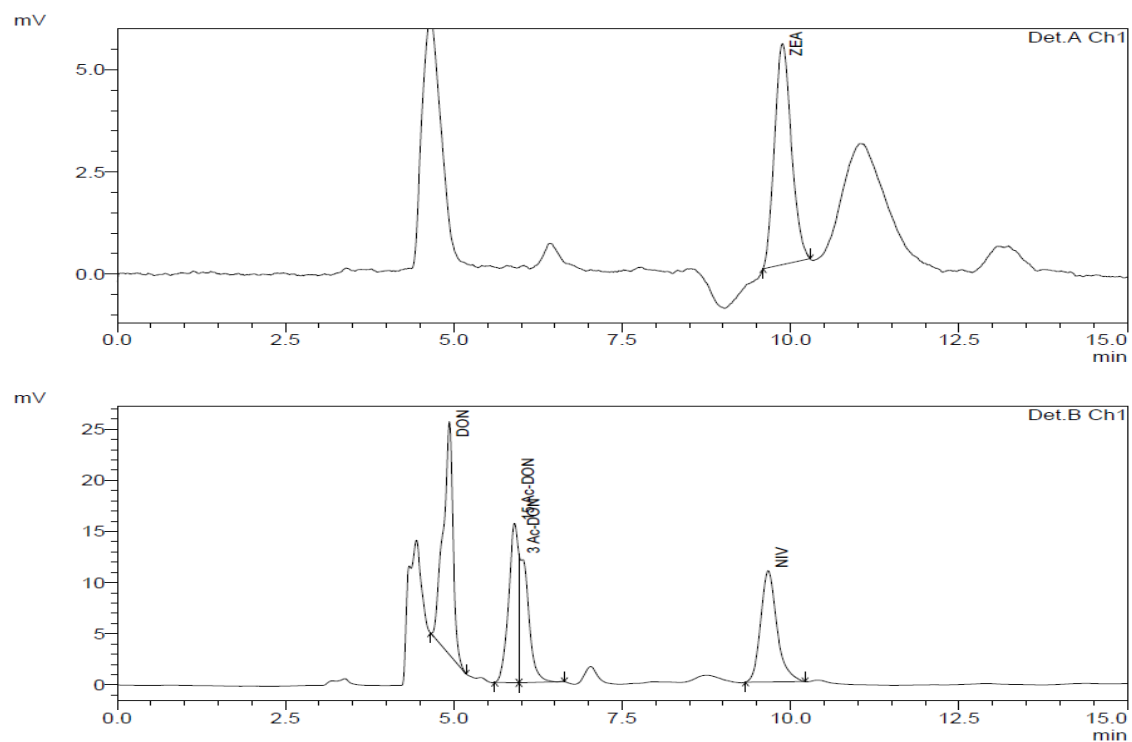
As equações das curvas analíticas dos padrões de micotoxinas e suas linearidades encontram-se na Tabela 6. E o cromatograma dos padrões das micotoxinas em HPLC-UV/FL estão apresentados na Figura 3.

Tabela 6. Equações das curvas analíticas dos padrões de micotoxinas e suas linearidades.

Micotoxina	Detector	Faixa de concentração (µg/mL)	Curva analítica	Tempo de retenção (min)	r
DON	UV	1-10	$y = 24071,33x - 465,06$	4,9	0,9903
15AcDON	UV	0,5-4	$y = 41896,36x - 412,40$	5,8	0,9985
3AcDON	UV	0,5-4	$y = 27585,18x - 258,81$	6	0,9984
NIV	UV	1-10	$y = 18003,08x + 1692,96$	9,6	0,9995
ZEA	FL	0,2-2	$y = 46778,41x - 498,54$	9,8	0,9977

UV=ultravioleta; FL=fluorescência; r = coeficiente de correlação.

Figura 3. Cromatograma dos padrões de micotoxinas no detector A (ZEA) e B (DON, 15AcDON, 3AcDON e NIV).



Os teores das micotoxinas detectadas nas biomassas fúngicas dos experimentos encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7. Micotoxinas DON, 15AcDON, 3AcDON, NIV e ZEA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) nos intervalos 3°, 7°, 14°, 24° e 30° dias de desenvolvimento do fungo.

	<i>F. graminearum</i> 08Tr031					<i>F. asiaticum</i> 09Ar004					<i>F. meridionale</i> 07Cv001					
	3	7	14	24	30	3	7	14	24	30	3	7	14	24	30	
C	DON	2037	3328	733	122	989	4685	4530	5269	5005	4528	12845	6530	9773	3861	4741
	15AcDON	120	117	nd	nd	nd	786	1976	2384	1517	618	nd	nd	nd	nd	nd
	3AcDON	53	493	nd	nd	nd	920	2608	4178	1986	632	nd	nd	nd	nd	nd
	NIV	15674	19389	19605	10813	3592	18109	20712	25098	25504	11234	4298	52472	21853	6736	21469
	ZEA	nd	nd	746	360	13	nd	nd	nd	616	930	nd	nd	nd	90	162
AZO	DON	2794	4072	749	706	58	11010	1042	1696	1973	1104	13538	4581	3834	3562	1280
	15AcDON	160	117	nd	nd	nd	nd	381	360	1477	1253	nd	nd	nd	nd	nd
	3AcDON	80	389	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	NIV	15594	20325	16224	26989	53336	15568	47928	108768	55117	38301	3608	4120	14477	14477	62661
	ZEA	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	66	nd	nd	nd	154	181
TRI	DON	2397	4005	626	58	53	1930	1378	1906	1234	1786	10138	1621	761	2594	1266
	15AcDON	96	42	nd	nd	nd	nd	794	360	1208	1821	nd	nd	nd	nd	nd
	3AcDON	50	333	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	NIV	11565	24938	22178	12501	8528	3109	82173	31064	55773	41298	4842	48392	4301	9258	23720
	ZEA	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	194	224
ORI	DON	2004	3141	701	127	125	4650	4152	4370	2704	1304	12456	5360	8512	1304	730
	15AcDON	123	nd	nd	nd	nd	nd	674	533	304	309	nd	nd	nd	nd	nd
	3AcDON	632	nd	nd	nd	nd	nd	1893	466	466	477	nd	nd	nd	nd	nd
	NIV	5306	5389	3336	2194	18250	4629	5240	2570	24968	1949	4272	10906	21744	3701	36288
	ZEA	nd	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	nd	1005	nd	nd	nd	86	161
EFN	DON	277	2914	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1138	1184	5277	3610	778	1328	1293
	15AcDON	nd	nd	nd	nd	nd	nd	341	744	200	248	nd	nd	nd	nd	nd
	3AcDON	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1138	821	152	357	nd	nd	nd	nd	nd
	NIV	nd	nd	nd	6677	1144	nd	18496	17885	1442	962	3989	8437	14930	16928	30405
	ZEA	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
EFF	DON	370	2962	nd	nd	nd	nd	2829	1704	1381	1322	1298	2685	464	1181	1125
	15AcDON	nd	nd	nd	nd	nd	nd	728	1314	386	384	nd	nd	nd	nd	nd
	3AcDON	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1826	3757	312	800	nd	nd	nd	nd	nd
	NIV	nd	nd	nd	21981	33808	nd	14626	5168	3197	482	2917	21944	4498	14202	49605
	ZEA	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

C=controle; AZO=azoxistrobina; TRI=trifloxistrobina; ORI= γ -orizanol; EFF=extrato fenólico do farelo; EFN=extrato fenólico do nim. nd=não detectado.

O γ -orizanol se destacou por sua capacidade de inibir ZEA, chegando a 100% de inibição nos fungos isolados do trigo e arroz (*F. graminearum* 08Tr031 e *F. asiaticum* 09Ar004).

Os extratos fenólicos (EF) inibiram e tardaram a produção de NIV, e os resultados sugerem que a reaplicação desses extratos no 14º dia poderia ser interessante para evitar o desencadeamento da produção dessa micotoxina. Os EF também inibiram 100% a produção de ZEA. O EFN se destacou pela maior inibição de DON e seus derivados acetilados.

As micotoxinas DON e NIV foram predominantes, principalmente no fungo isolado da cevada (*F. meridionale* 07Cv001) em que DON variou de 13538 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (AZO) a 464 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (EFF), e NIV variou entre 62661 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (AZO) a 3701 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ORI). Esse fungo não produziu 15AcDON nem 3AcDON e a ZEA foi produzida somente após 24 dias de cultivo.

Os compostos sintéticos, azoxistrobina e trifloxistrobina, afetaram a produção de micotoxinas de forma aleatória, algumas vezes induzindo e outras inibindo a sua produção.

A relação entre a inibição dos fungos e da produção de suas micotoxinas vem sendo bastante estudada. No estudo de Ferrochio et al., (2013), o ácido ferúlico (5.10^{-3} mM) não mostrou efeito sobre o desenvolvimento de *F. verticillioides*, mas houve uma redução de 90% na produção de FB₁. Dambolena et al., (2011), Samapundo et al., (2007) e Torres et al., (2003) sugeriram que os mecanismos de inibição da produção de fumonisina por compostos fenólicos estão relacionados com a inibição do crescimento de espécies de *Fusarium*. Porém, Ferrochio et al., (2013) discordam porque 10 mM de ácido ferúlico inibiu o crescimento de fungos, mas estimulou a produção de fumonisina. Por outro lado, a concentração de 1 mM de ácido ferúlico estimulou não só o crescimento, mas também a produção da fumonisina, sugerindo que não existe uma relação direta entre a utilização de ácido ferúlico e inibição de crescimento ou produção de fumonisina.

Neste trabalho, a Concentração Média Inibitória (MIC₅₀) contra *Fusarium graminearum*, foi de 0,9 g/kg para γ -orizanol; 0,032 g/kg para EFF e 0,037 g/kg para EFN (Tabela 2). Desta forma, os extratos fenólicos são mais eficientes e eficazes para inibição de linhagens de *F. graminearum*. Também foi possível observar (Tabela 7) que os extratos naturais se destacaram pela capacidade de inibição da produção de micotoxinas pela biomassa fúngica, com destaque para o EFN sobre a produção de

DON, 15AcDON, 3AcDON e ZEA. Desta forma, é possível dizer que há uma relação direta entre a inibição do fungo e a manifestação do seu potencial toxigênico.

3.3 Expressão dos genes envolvidos na síntese dos tricotecenos

Foi possível observar que a expressão do gene *Tri5*, que gera tricodieno, precursor dos tricotecenos, está diretamente relacionada com o nível de produção de DON (Figura 4). Não foi possível traçar uma relação entre as demais micotoxinas com nenhum dos genes estudados. Outros estudos (DOOHAN et al., 1999) também mostraram que há relação direta entre conteúdo de DON e o gene de expressão *Tri5* medido por PCR quantitativa. Isso pode ter ocorrido porque DON é a primeira micotoxina sintetizada na rota metabólica dos tricotecenos (BROWN et al., 2002).

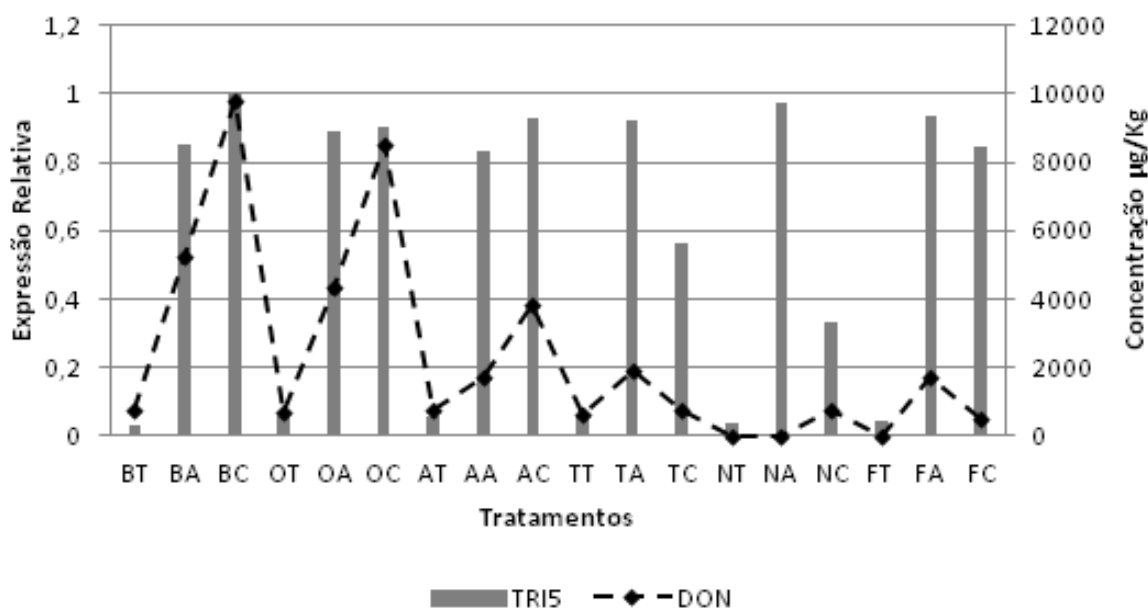
A caracterização molecular do *cluster Tri*, permite observar que a maioria dos genes codificantes da via metabólica dos tricotecenos encontram-se no *cluster Tri5* (HOHN et al., 1995; LEE et al., 2002; MCCORMICK et al., 1996), e que alguns genes estão envolvidos na biossíntese de quimiotipos específicos, codificando proteínas-chave na determinação dos quimiotipos. Por exemplo, a síntese da 15-O-acetil-transferase pelo gene *Tri3*, aparenta ser essencial para a determinação do quimiotipo 15ADON (MCCORMICK et al., 1996). O gene *Tri13* codifica uma oxigenase que hidroxila o C-4, resultando na toxina NIV (LEE et al., 2002).

No tipo B de tricotecenos, o gene *Tri1* controla a adição dos grupos hidroxila no C-7 e C-8. Na etapa final da biossíntese é removido o grupo acetil do C-3 ou do C-15 por uma esterase codificada por *Tri8*. A atividade dessa esterase determina a produção de 3ADON ou 15ADON em *F. graminearum* (MCCORMICK et al., 1996). Dessa forma, o gene *Tri1* está envolvido na biossíntese de tricotecenos, porém, neste trabalho, não mostrou ter uma relação direta com as micotoxinas estudadas.

Fusarium graminearum 08TR31 expressou menos *Tri5* quando comparado as duas outras linhagens estudadas, bem como foi o que produziu menos DON.

Esses resultados indicam que os antifúngicos naturais estudados afetaram a expressão da via biossintética dos tricotecenos. A relação direta entre a produção de *Tri5* e a produção de DON mostra que a alteração ocorre já no início da via de biossíntese.

Figura 4. Micotoxina DON ($\mu\text{g}/\text{kg}$) e expressão relativa das linhagens de *F. graminearum* estudadas.



BT- branco (*Fg* do trigo); BA-branco (*Fg* do arroz); BC-branco (*Fg* da cevada); OT-orizanol (*Fg* do trigo); OA-orizanol (*Fg* do arroz); OC-orizanol (*Fg* da cevada); AT-azoxistrobina (*Fg* do trigo); AA-azoxistrobina (*Fg* do arroz); AC-azoxistrobina (*Fg* da cevada); TT- trifloxistrobina (*Fg* do trigo); TA-trifloxistrobina (*Fg* do arroz); TC-trifloxistrobina (*Fg* da cevada); NT-fenol do nim (*Fg* do trigo); NA- fenol do nim (*Fg* do arroz); NC- fenol do nim (*Fg* da cevada); FT-fenol do farelo (*Fg* do trigo); FA- fenol do farelo (*Fg* do arroz); FC- fenol do farelo (*Fg* da cevada).

4 CONCLUSÃO

Os extratos fenólicos são mais eficientes e eficazes para inibição de linhagens do complexo *F. graminearum* do que o γ -orizanol, dado pelas Concentrações Médias Inibitórias (MIC_{50}) de 0,9 g/kg para γ -orizanol; 0,032 g/kg para extrato fenólico do farelo de arroz e 0,037 g/kg para extrato fenólico das sementes de nim. Além disso, os extratos naturais demonstraram capacidade de inibir a produção de micotoxinas pela biomassa fúngica, com destaque para o extrato fenólico do nim. Desta forma, é possível dizer que há uma relação direta entre a inibição do fungo e a manifestação do seu potencial toxigênico.

As enzimas hidrolíticas do metabolismo primário do fungo foram afetadas por todos os compostos utilizados (naturais e sintéticos) apresentando inibições médias de suas atividades variando entre 59 e 13% para a α -amilase e 56 e 28% para as proteases, respectivamente, pelo γ -orizanol e azoxistrobina e γ -orizanol e extrato fenólico do farelo

de arroz. Esta demonstração contribui para elucidar o mecanismo de ação dos compostos estudados.

Os tratamentos com antifúngicos ocasionaram modificação a nível molecular, alterando os níveis de expressão gênica. O gene *Tri5* mostra uma relação direta com a produção de DON e indicou que os efeitos inibitórios ocorrem já no início da via biossintética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Consulta Pública n° 77, 2005.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Consulta Pública n° 57, 2003.

ASTOLFI, P.; SANTOS, J.; SCHNEIDER, L.; GOMES, L. B.; SILVA, C. N.. TESSMANN, D. J.; DEL PONTE, E. M. Molecular survey of trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* species complex from barley in Southern Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, p.197-201, 2011.

ASTOLFI, P.; SANTOS, J.; SPOLTI, P.; TESSMANN, D. J.; PONTE, E. M. D. Complexo *Fusarium graminearum*: taxonomia, potencial toxigênico e genética populacional na era molecular. **Revista Anual de Patologia de Plantas**, v. 18, p. 78-119, 2010.

BROWN, D. W.; MCCORMICK, S. P.; ALEXANDER, N. J.; PROCTOR, R. H.; DESJARDINS, A. E. Inactivation of a cytochrome P-450 is a determinant of trichothecene diversity in *Fusarium* species. **Fungal Genetics and Biology**, v. 36, p. 224–233, 2002.

CARVALHO, A. P. P. Aflatoxinas: ocorrência, distribuição e estimativa de ingestão através de produtos de amendoim na cidade de Piracicaba-São Paulo. 2005. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 174–181, 2012.

DAMBOLENA, J. S.; ZYGADLO, J. A.; RUBINSTEIN, H. R. Antifumonis activity of natural phenolic compounds. A structure property activity relationship study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. 140–146, 2011.

DOOHAN F. M.; WESTON, G.; REZANOOR, H. N.; PARRY, D. W.; NICHOLSON, P. Development and use of a reverse transcription-PCR assay to study expression of *Tri5* by *Fusarium* species *in vitro* and in plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3850-3854, 1999.

ECOBICHON, D. J. Toxic effects of pesticides. In: AMDUR, M. O.; DOULL, J.; KLAASSEN, C. D. **Casarett and Doll's toxicology: the basic science of poisons**. 4. ed. New York: Mc Graw Hill, 1993.

FARIA, N. M. X.; FASSA, A. G.; FACCHINI, L. A. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, 2007.

FERROCHIO, L.; CENDOYA, E.; FARNOCHI, M. C.; MASSAD, W.; RAMIREZ, M. L. Evaluation of ability of ferulic acid to control growth and fumonisin production of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on maize based media. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, p. 215-220, 2013.

FORIM, M. R.; MATOS, A. P.; SILVA, M. F. G. F.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B. Uso de CLAE no controle de qualidade em produtos comerciais de nim: reprodutibilidade da ação inseticida. **Química Nova**, v. 33, n. 5, p. 1082-1087, 2010.

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

GIZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, v. 30, p. 503-512, 2002.

GUTAROWSKA, B.; ZAKOWSKA, Z. Mathematical models of mycelium growth and ergosterol synthesis in stationary mould culture. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p. 605-610, 2009.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; MENDES, G. L.; SCAGLIONI, P. T.; BADIALE-FURLONG E. SOUZA-SOARES, L. A. Biochemistry and metabolism of mycotoxins: A review. **African Journal of Food Science**, v. 5, n. 16, p. 861-869, 2011.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; NORA, N. S.; BADIALE-FURLONG, E. Extraction of γ -oryzanol from rice bran. **African Journal of Food Science**, v. 5, n. 16, p. 861-869, 2012.

HOHN, T.M.; DESJARDINS, A.E.; MCCORMICK, S.P. The *Tri4* gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P450 monooxygenase involved in trichothecene biosynthesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 248, p. 95–102, 1995.

LEE, T.; HAN, Y. K.; KIM, K. H.; YUN, S. H.; LEE, Y. W. Tri13 and Tri7 determine deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae*. **Applied Environmental and Microbiology**, v. 68, p. 2148–2154, 2002.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* Laboratory Manual**. Blackwell Publishing: Ames, 2006.

LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LÓPEZ-PANTOJA, Y.; ANGULO-ESCALANTE, M.; MARTÍNEZ-RODRIGUEZ, C.; SOTO-BELTRÁN, J.; CHAIDEZ-QUIROZ, C. Efecto antimicrobiano de extractos crudos de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) y venadillo (*Swietenia humilis* Zucc) contra *E. coli*, *S. aureus* y el bacteriógrafo P22. **Bioquimia**, v. 32, n. 4, p. 117-125, 2007.

MCCORMICK, S. P., T. M. HOHN, AND A. E. DESJARDINS. Isolation and characterization of *Tri3*, a gene encoding 15-*O*-acetyltransferase from *Fusarium sporotrichioides*. **Applied Environmental and Microbiology**, v. 62, p. 353–359, 1996.

NATHAN, S. S.; CHOI, M. Y.; PAIK, C. H.; SEO, H. Y.; KIM, J. D.; KANG, S. M. The toxic effects of neem extract and azadirachtin on the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (BPH) (Homoptera: Delphacidae). **Chemosphere**, v. 67, p. 80–88, 2007.

NIGAM, P.; SINGH, D. Solid-State Substrate Fermentation System and their Applications in Biotechnology. **Journal Basic Microbiology**, v. 34, n. 6, p. 405-423, 1994.

PAGNUSSATT, F. A.; KUPSKI, L.; DARLEY, F. T.; FILODA, P. F.; PONTE, E. M.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. *Fusarium graminearum* growth inhibition mechanism using phenolic compounds from *Spirulina* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, p. 75-80, 2013.

PAGNUSSATT, F. A.; DEL PONTE, E. M.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and mycotoxin production

by phenolic extract from *Spirulina* sp. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 108, p. 21-26, 2014.

PEREIRA, A. V. S. **Sensibilidade a fungicidas e adaptabilidade de *Lasiodiplodia theobromae* patogênico ao mamão**. 2009. 57 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, 2009.

SAMAPUNDO, S.; DE MEULENAER, B.; OSEI-NIMOH, D.; LAMBONI, Y.; DEBEVERE, J.; DEVLIEGHERE, F. Can phenolic compounds be used for the protection of corn from fungal invasion and mycotoxin contamination during storage. **Food Microbiology**, v. 24, p. 465-473, 2007.

SEUS, E. R. Otimização de método para a determinação de tricotecenos em amostras de trigo. 2014. Dissertação 122 f. (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2014.

SOUZA, M. M.; PRIETTO, L.; RIBEIRO, A. C.; SOUZA, T. D.; BADIALE-FURLONG, E. Assessment of the antifungal activity of *Spirulina platensis* phenolic extract against *Aspergillus flavus*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1050-1058, 2011.

SOUZA, M. M.; PRIETTO, L.; RIBEIRO, A. C.; SOUZA, T. D.; BADIALE-FURLONG, E. Assessment of the antifungal activity of *Spirulina platensis* phenolic extract against *Aspergillus flavus*. **Ciência e Agrotecnologia de Lavras**, v. 35, n. 6, p. 1050-1058, 2011.

SOUZA, M. M.; ROCHA, M.; OLIVEIRA, M. S.; BADIALE-FURLONG, E. Avaliação das atividades antifúngica e antimicotoxina de extratos fenólicos de farelo de arroz. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 437-441, 2012.

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

TIAN, J.; HUANG, B.; LUO, X.; ZENG, H.; BAN, X.; HE, J.; WANG, Y. The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand.-Mazz essential oil and its potential use as a food preservative. **Food Chemistry**, v.130, n. 3, p. 520–527, 2012.

TORRES, A.; RAMIREZ, M.L.; ARROYO, M.; CHULZE, S.; MAGAN, N. Potential for control of growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* and *F.proliferatum* on irradiated maize grain using anti-oxidants. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, p. 319–324, 2003.

VACLAVIK, L.; ZACHARIASOVA, M.; HRBEK, V.; HAJŠLOVA, J.
Analysis of multiple mycotoxins in cereals under ambient conditions using direct
analysis in real time (DART) ionization coupled to high resolution mass spectrometry.
Talanta, v. 82, p 1950-1957, 2010.

CAPÍTULO IV

4 CONCLUSÃO

Um método de extração de γ -orizanol de farelo de arroz preciso e exato foi obtido usando baixa temperatura e solvente de baixa toxicidade. O γ -orizanol (14 mg/g) é mais estável em isopropanol do que em hexano, onde mantém 100% da concentração em temperatura de refrigeração por mais de dois meses. Além disso, ele é rico em ácidos graxos insaturados (84%), que são benéficos à saúde.

O ácido gálico foi predominante nos extratos fenólicos de farelo de arroz (EFF) e de sementes de nim (EFN), representando 67 e 85% do total de ácidos fenólicos, respectivamente.

O EFF apresenta atividade antioxidante destacada em relação aos demais extratos naturais para inibir a iniciação do processo, a propagação do radical livre e a catálise enzimática.

Os extratos fenólicos são mais eficientes e eficazes para inibição do *F. graminearum*, demonstrado pela Concentração Média Inibitória (MIC₅₀) que foi de 0,9 g/kg para γ -orizanol; 0,032 g/kg para EFF e 0,037 g/kg para EFN.

Os extratos naturais afetaram as atividades das enzimas α -amilase e proteases, e ocasionaram a redução da formação de componentes estruturais do fungo (glicosamina e ergosterol), possivelmente como consequência da diminuição do aporte de nutrientes do meio provocado pela ausência ou inibição da enzima.

Os extratos naturais se destacaram pela capacidade de inibição de micotoxinas produzidas pela biomassa fúngica, com destaque para o EFN sobre a produção de DON, 15AcDON, 3AcDON e ZEA.

Os tratamentos antifúngicos ocasionaram modificação a nível molecular, alterando os níveis de expressão gênica. O gene *Tri5* mostra uma relação direta com a produção de DON e indicou que os efeitos inibitórios ocorrem já no início da via biossintética.

Sendo assim, é possível dizer que há uma relação direta entre a atividade antioxidante na inibição do fungo e na manifestação do seu potencial toxigênico. Além disso, esse estudo contribuiu com a elucidação do mecanismo de ação dos antifúngicos naturais estudados.

5 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Verificar o efeito da mistura dos compostos fenólicos na inibição de linhagens do *Fusarium graminearum* e do seu potencial toxigênico.

Estudar *in vivo* o efeito dos compostos naturais contra linhagens do Complexo *F. graminearum*.

CAPÍTULO V

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, C. Q.; BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; LIMA, L. S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. **Revista de rede de ensino FTC**, n. 12, 2007.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Consulta Pública n° 57, 2003.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Consulta Pública n° 77, 2005.

ASSIS, L. M. **Atividade antioxidante de extratos de microalgas *Spitulina* LEB-18 e *Chlorella pyrenoidosa* e estudo da sua nanoencapsulação em lipossomas.** 2012. 85 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2012.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official Methods of Analysis of International.** Horwitz, W. (Ed.). 17 ed. Arlington, 2000. (CD – ROM).

ASTOLFI, P.; SANTOS, J.; SPOLTI, P.; TESSMANN D. J.; DEL PONTE E. M. Complexo *Fusarium graminearum*: taxonomia, potencial, potencial toxigênico e genética populacional na era molecular. **Revista Anual de Patologia de Plantas**, v. 18, p. 78-119, 2010.

ASTOLFI, P.; SANTOS, J.; SCHNEIDER, L.; GOMES, L. B.; SILVA, C. N.. TESSMANN, D. J.; DEL PONTE, E. M. Molecular survey of trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* species complex from barley in Southern Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, p.197-201, 2011.

AZRINA, A.; MAZNAH, I.; AZIZAH, A.H. Extraction and determination of oryzanol in rice bran of mixed herbarium UKMB; AZ 6807: MR 185, AZ 6808: MR 211, AZ 6809: MR 29. **ASEAN Food Journal**, v. 15, n. 1, p. 89-96, 2008.

BARROS, G.; GARCÍA, D.; OVIEDO, S.; RAMIREZ, M.L.; TORRES, A.; CHULZE, S. Deoxynivalenol and nivalenol analysis in soybean and soy flour. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, n. 3, p. 263-266, 2008.

BHONDE, S. B.; DESHPANDE, S. G.; SHARMA, R. N. In vitro evaluation on inhibitory nature of some Neem formulations against plant pathogenic fungi. **Hindustan Antibiot Bulletin**. v. 41, p. 22-24, 1999.

BIERHALS, V. S.; MACHADO, V. G.; ECHEVENGUÁ, W. O.; COSTA, J. A. V.; FURLONG, E. B. Compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e antifúngica de multimisturas enriquecidas com a microalga *Spirulina platensis*. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 1, p. 42-48, 2009.

BRASIL, Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa; Publica o “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”, Diário Oficial da União, Brasília (DF), de 02 de junho de 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Fundação de Ciência e Tecnologia – CIENTEC. **Métodos analíticos para controle de alimentos para uso animal**. INTERLAB VI. Portaria 108, de 4 de setembro de 1991. Diário Oficial da União, 17 de setembro de 1991, seção I, p. 19813.

BROWN, D. W.; MCCORMICK, S. P.; ALEXANDER, N. J.; PROCTOR, R. H.; DESJARDINS, A. E. Inactivation of a cytochrome P-450 is a determinant of trichothecene diversity in *Fusarium* species. **Fungal Genetics and Biology**, v. 36, p. 224–233, 2002.

BUCCI, R.; MAGRÌ, A.D.; MAGRÌ, A.L.; MARINI, F. Comparison of three spectrophotometric methods for the determination of γ -oryzanol in rice bran oil. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 375, n. 8, p. 1254–1259, 2003.

CAO L, SI JY, LIU Y, SUN H, JIN W, LI Z, ZHAO XH, LE PAN R. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant properties of *Mosla chinensis* Maxim. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 801-805.

CARNEIRO, S. M. T. P. G. Efeito de extratos de folhas e óleo de nim sobre o oídio do tomateiro. **Summa Phytopathologia**. v. 29, n. 1, p. 262-265, 2003.

CARVALHO, A. P. P. Aflatoxinas: ocorrência, distribuição e estimativa de ingestão através de produtos de amendoim na cidade de Piracicaba-São Paulo. 2005. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CHAVES, M. B. S. C.; MARCONDES, L. H. Q.; PIVA, P. A.; KONRATH, I.; T.; GRAÇAS, S. B.; GERRERO, A. T. G.; GUILHERMINO, J. F.; YANO, M. Determinação dos teores de fenóis totais, quinonas e atividade antioxidante do noni (*Morindacitrifolia*) e do nim indiano. **Revista de Biotecnologia e Ciência**, v. 1, n. 2, 2013.

CHIM, J. F.; ZAMBIAZI, R. C.; LEITÃO, A. M. Farelo de arroz: capacidade antioxidante de frações ricas em orizanol. **Boletim do centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 279-288, 2006.

CHOTIMAKORN, C.; BENJAKUL, S.; SILALAI, N. Antioxidant components and properties of five long-grained rice bran extracts from commercial available cultivars in Thailand. **Food Chemistry**, v. 111, n. 3, p. 636-641, 2008.

COSGROVE, J.P., CHURCH, D.F., PRYOR, W.A. The kinetics of autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids*. **Champaign**, v. 22, n. 5, p. 299-304, 1987.

COUTINHO, W. M.; PEREIRA, L. A. A.; MACHADO, J. C.; MAGALHAES, F. H. L.; PENA, R. C. M. P.; VIEIRA, M. G. G. C. Qualidade fisiológica de sementes de arroz em função da ocorrência diferenciada de *Drechslera oryzae*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n. 1, p. 124-129, 2000.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 174–181, 2012.

DAMBOLENA, J. S.; ZYGADLO, J. A.; RUBINSTEIN, H. R. Antifumonis activity of natural phenolic compounds. A structure property activity relationship study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. 140–146, 2011.

DOOHAN F. M.; WESTON, G.; REZANOOR, H. N.; PARRY, D. W.; NICHOLSON, P. Development and use of a reverse transcription-PCR assay to study expression of *Tri5* by *Fusarium* species *in vitro* and in plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3850-3854, 1999.

DORS, G. C. **Uso de fungicida no cultivo do arroz irrigado e seus efeitos na composição físico-química, bioquímica e micotoxicológica dos derivados do grão**. 2010. 170 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2010.

DORS, G. C.; CALDAS, S. S.; HACKBART, H. C. S.; PRIMEL, E. G.; FAGUNDES, C. A. A.; BADIALE-FURLONG, E. Fungicides and the Effects of Mycotoxins on Milling Fractions of Irrigated Rice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 1985–1990, 2013.

ECOBICHON, D. J. Toxic effects of pesticides. In: AMDUR, M. O.; DOULL, J.; KLAASSEN, C. D. **Casarett and Doll's toxicology: the basic science of poisons**. 4. ed. New York: Mc Graw Hill, 1993.

EZEKIEL, C. N.; WARTH, B.; OGARA, I. M.; ABIA, W. A.; EZEKIEL, V. C.; ATEHNKENG, J.; SULYOK, M.; TURNER, P. C.; TAYO, G. O.; KRKA, R.;

BANDYOPADHYAY, R. Mycotoxin exposure in rural residents in northern Nigeria: a pilot study using multi-urinary biomarkers. **Environment International**, v. 66, p. 138–145, 2014.

FARIA, N. M. X.; FASSA, A. G.; FACCHINI, L. A. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, 2007.

FARNOCHI, M. C.; TORRES, A. M.; MAGAN, N.; CHULZE, S. N. Effect of antioxidants and competing mycoflora on *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* populations and fumonisin production on maize grain **Journal of Stored Products Research**, v. 41, p. 211–219, 2005.

FERREIRA, C. M.; PINHEIRO, B. S.; SOUSA, I. S. F.; MORAIS, O. P. Qualidade do arroz no Brasil: evolução e padronização. **Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão**, p. 61, 2005.

FERROCHIO, L.; CENDOYA, E.; FARNOCHI, M. C.; MASSAD, W.; RAMIREZ, M. L. Evaluation of ability of ferulic acid to control growth and fumonisin production of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on maize based media. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, p. 215-220, 2013.

FILHO, F. C. C.; CALVET, R. M.; ROSA, C. A. R.; PEREIRA, M. M. G.; COSTA, A. P. R.; MURATORI, M. C. S. Monitoramento de fungos toxigênicos e aflatoxinas em rações utilizadas em piscicultura. **Ciência Animal Brasileira.**, v. 14, n. 3, p. 305-311, 2013.

FORIM, M. R.; MATOS, A. P.; SILVA, M. F. G. F.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B. Uso de CLAE no controle de qualidade em produtos comerciais de nim: reprodutibilidade da ação inseticida. **Química Nova**, v. 33, n. 5, p. 1082-1087, 2010.

FRANCIS, F.; SABU, A.; NAMPOOTHIRI, K. M.; RAMACHANDRAN, S.; GHOSH, S.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 15, n. 2, p. 107–115, aug., 2003.

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

GARP - ASSOCIAÇÃO GRUPO DE ANALISTAS DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS. Manual de resíduos de pesticidas em alimentos, 1999.

GIZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, v. 30, p. 503-512, 2002.

GUMIERO, V. C. **Estudo do efeito de hipersensibilidade do extrato de nome (*Azadirachta indica*) sobre cultura de células de *Rubus fruticosus***. 2008. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2008.

GUTAROWSKA, B.; ZAKOWSKA, Z. Mathematical models of mycelium growth and ergosterol synthesis in stationary mould culture. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p. 605–610, 2009.

HAALAND, P. D. **Experimental design in biotechnology**. New York : Marcel Dekker, 1989. 284p.

HALLIWEL B, AESCHBACH R, LOLIGER J, AROUMA O. I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R. Efeito do emprego de fungicidas no desenvolvimento e manifestação do potencial toxigênico de *Fusarium graminearum* em arroz. Rio Grande, FURG, 2011. 140 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul. 2011b.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; HACKBART H. C. S.; SOUZA, M. M.; DORS, G.; FAGUNDES, C. A.; BADIALE-FURLONG, E. Determinação de deoxinivalenol e zearalenona em arroz natural e parboilizado e suas frações utilizando QuEChERS e HPLC/UV-FL. **Química Nova**, v. 35, n. 6, 2012b.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; MENDES, G. L.; SCAGLIONI, P. T.; BADIALE-FURLONG E. SOUZA-SOARES, L. A. Biochemistry and metabolism of mycotoxins: A review. **African Journal of Food Science**, v. 5, n. 16, p. 861-869, 2011.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; NORA, N. S.; BADIALE-FURLONG, E. Extraction of γ -oryzanol from rice bran. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, n. 6, p. 665-673, 2012.

HEMEDA, H. M.; KLEIN, B. P. Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetable extracts. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 1, p.184-185, 1990.

HERRERO, M., MARTÍN-ÁLVAREZ, P., SEÑORÁNS, F.J., CIFUENTES, A., IBÁÑEZ, E. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. **Food Chemistry**, v. 93, p.417–423, 2005.

HOELTZ, M.; WELKE, J. E.; NOLL, I. B.; DOTTORI, H. A. Photometric procedure for quantitative analysis of aflatoxin b1 in peanuts by thin-layer chromatography using charge coupled device detector. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 43-47, 2010.

HOHN, T. M.; DESJARDINS, A. E.; MCCORMICK, S. P. The *Tri4* gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P450 monooxygenase involved in trichothecene biosynthesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 248, p. 95–102, 1995.

HU, W.; WELLS, J.H.; SHIN, T.S.; GODBER, J.S. Comparison of isopropanol and hexane for extraction of vitamin E and oryzanol from stabilized rice bran. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 73, n. 2, p. 1653-1656, 1996.

HÝSEK, J.; VÁŇOVÁ, M.; HAJŠLOVÁ, J.; BROŽOVÁ, J.; SYCHROVÁ, E.; RADOVÁ-SYPECKÁ, Z.; ŠÍP V.; SÝKOROVÁ, S.; CHRPOVÁ, J.; TVARŮŽEK, L. Variation in the production of trichothecene mycotoxin deoxynivalenol (DON) in spring barley varieties after treatment with the fungicides azoxystrobin and tebuconazole. **Plant Protection Science**, v. 41, n. 2, p. 58–62, 2005.

ICH. International Conference on Harmonisation. **Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology**, 1995. Disponível em:<<http://www.pharma.gally.ch/ich/q2a038195en.pdf>>. Acesso em: 25 jun. 2012.

ISMAIL, M.; AL-NAQEEB, G.; MAMAT, W. A. A.; AHMAD, Z. Gamma-oryzanol rich fraction regulates the expression of antioxidant and oxidative stress related genes in stressed rat's liver. **Nutrition and Metabolism**, 2010.

JEONG-YONG, C.; HYOUNG, J. L.; GEE, A. K.; YOU, S. L.; SOO, C. S.; KEUN-HYUNG, P.; JAE-HAK, M. Quantitative analyses of individual γ -oryzanol (Steryl Ferulates) in conventional and organic brown rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Cereal Science**, v. 55, p. 337-343, 2012.

JESUS, S. P. **Recuperação de γ -oryzanol a partir de resíduo da indústria de óleo de arroz utilizando extração supercrítica: avaliação de parâmetros de processo e caracterização dos extratos**. 2010. 143 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

JULIANO, C.; COSSU, M.; ALAMANNI, M. C.; PIU, L. Antioxidant activity of gamma-oryzanol: Mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oils. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 299, p. 146–154, 2005.

KEDIA, A.; PRAKASH, B.; MISHRA, P. K.; DUBEY, N. K. Antifungal and antiaflatoxic properties of *Cuminum cyminum* (L.) seed essential oil and its efficacy as a preservative in stored commodities. **International Journal of Food Microbiology**, p. 168-169, 2014.

KOUL, O.; ISMAN, M., B. Effects of azadirachtin on the dietary utilization and development of the Variegated Cutworm *Peridroma saucia*. **Journal of Insect Physiology**, v. 37, p. 591-598, 1991.

KRUVE, A.; LEITO, I.; HERODES, K. Combating matrix effects in LC/ESI/MS: The extrapolative dilution approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 651, n. 1, p. 75–80, 2009.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

KYUNG-EUN, L.; BYUNG, H. K.; CHAN, L. Occurrence of *Fusarium* mycotoxin beauvericin in animal feeds in Korea. **Animal Feed Science and Technology**, v. 157, p. 190–194, 2010.

LEE, T.; HAN, Y. K.; KIM, K. H.; YUN, S. H.; LEE, Y. W. Tri13 and Tri7 determine deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae*. **Applied Environmental and Microbiology**, v. 68, p. 2148–2154, 2002.

LERMA-GARCÍA, M.J.; HERRERO-MARTÍNEZ, J.M.; SIMÓ-ALFONSO, E.F.; MENDONÇA, C.R.B.; RAMIS-RAMOS, G. Composition, industrial processing and applications of rice bran γ -oryzanol. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 389-404, 2009.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* Laboratory Manual**. Blackwell Publishing: Ames, 2006.

LILITCHAN, S.; TANGPRAWAT, C.; ARYUSUK, K.; KRISNANGKURA, S.; CHOKMONH, S.; KRISNANGKURA, K. Partial extraction method for the rapid analysis of total lipids and γ -oryzanol contents in rice bran. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 752-759, 2008.

LIMA A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*caryocar brasiliense*, camb.).** 2008. 181 f. Tese (Doutorado em Bromatologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT Method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LOPES, M. M. A.; MIRANDA, M. R. A.; MOURA, C. F. H.; FILHO, J. E. Bioactive compounds and total antioxidant capacity of cashew apples (*Anacardium occidentale* L.) during the ripening of early dwarf cashew clones. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, n. 3, p. 325-332, 2012.

LÓPEZ-PANTOJA, Y.; ANGULO-ESCALANTE, M.; MARTÍNEZ-RODRIGUEZ, C.; SOTO-BELTRÁN, J.; CHAIDEZ-QUIROZ, C. Efecto antimicrobiano de extractos crudos de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) y venadillo (*Swietenia humilis* Zucc) contra *E. coli*, *S. aureus* y el bacteriógrafo P22. **Bioquímica**, v. 32, n. 4, p. 117-125, 2007.

LUH, B.; BARBERS, S.; BARBER, C. B. **Rice bran: chemistry and technology.** In: LUH, B. S. **Rice: utilization.** 2 ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991.

MARTINEZ, S. S. O uso do Nim no café e em outras culturas. **Revista Agroecologia Hoje**. n. 4, p. 13-14, 2003.

MARTÍNEZ-ROMERO, D.; SERRANO, M.; BAILÉN, G.; GUILLÉN, F.; ZAPATA, P. J.; VALVERDE, J. M.; CASTILLO, S.; FUENTES, M.; VALERO, D. The use of a natural fungicide as an alternative to preharvest synthetic fungicide treatments to control lettuce deterioration during postharvest storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 47, p. 54–60, 2008.

MCCORMICK, S. P., T. M. HOHN, AND A. E. DESJARDINS. Isolation and characterization of *Tri3*, a gene encoding 15-*O*-acetyltransferase from *Fusarium sporotrichioides*. **Applied Environmental and Microbiology**, v. 62, p. 353–359, 1996.

METCALFE, L. D.; SCHMITZ, A. A.; PELKA, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. **Analytical Chemistry**, v. 38, n. 3, p. 514-515, 1966.

MONACI, L.; ANGELIS, E.; VISCONTI, A. Determination of deoxynivalenol, T-2 and HT-2 toxins in a bread model food by liquid chromatography–high resolution-

Orbitrap-mass spectrometry equipped with a high-energy collision dissociation cell. **Journal of Chromatography A**, n. 1218, n. 48, p. 8646–8654, 2011.

MORO, J. D.; ROSA, C. S.; HOELZEL, S. C. S. M. Composição centesimal e ação antioxidante do farelo de arroz e seus benefícios à saúde. **Disciplinarum Scientia**, v. 4, n. 1, p. 33-44, 2004.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Journal of Nutrition**, v. 29, n. 4, p. 273-300, 1990.

NATHAN, S. S.; CHOI, M. Y.; PAIK, C. H.; SEO, H. Y.; KIM, J. D.; KANG, S. M. The toxic effects of neem extract and azadirachtin on the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (BPH) (Homoptera: Delphacidae). **Chemosphere**, v. 67, p. 80–88, 2007.

NAWAR, W. W. Lipids. In: FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. 2.ed. New York : Marcel Dekker, 1985.

NGUEFACK, J.; LETH V.; 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.

NIELSEN, K. F.; SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography–UV–mass spectrometry methodology. **Journal of Chromatography A**, v. 1002, n. 1-2, p. 111–136, 2003.

NIGAM, P.; SINGH, D. Solid-State Substrate Fermentation System and their Applications in Biotechnology. **Journal Basic Microbiology**, v. 34, n. 6, p. 405-423, 1994.

OLIVEIRA, M. S.; BADIALE-FURLONG, E. Screening of antifungal and antimycotoxigenic activity of plant phenolic extracts. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, n. 2, p. 1-10, 2008.

OLIVEIRA, M. S.; DORS, G. C.; SOUZA-SOARES, L. A.; BADIALE-FURLONG, E. Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, n. 3, p. 267-275, 2007.

PAGNUSSATT, F. A.; KUPSKI, L.; DARLEY, F. T.; FILODA, P. F.; PONTE, E. M.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. *Fusarium graminearum* growth inhibition mechanism using phenolic compounds from *Spirulina* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, p. 75-80, 2013.

PAGNUSSATT, F. A.; DEL PONTE, E. M.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and mycotoxin production by phenolic extract from *Spirulina* sp. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 108, p. 21-26, 2014.

PASCUAL, C. S. C. I.; MASSARETTO, I. L.; KAWASSAKI, F.; BARROS, R. M. C.; NOLDIN, J. A.; MARQUEZ, U. M. L. Effects of parboiling, storage and cooking on the levels of tocopherols, tocotrienols and γ -oryzanol in brown rice (*Oryza sativa* L.). **Food Research International**, v. 50, n. 2, p. 676-681, 2013.

PAUCAR-MENACHO, L. M.; SILVA, L. H.; SANT'ANA, A. S. GONÇALVES, L. A. G. Refino de óleo de farelo de arroz (*Oryza sativa* L.) em condições brandas para preservação do γ -orizanol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 45-53, 2007.

PAVIANI, V. **Efeito do extrato de *Azadirachta indica* (nim) sobre resposta de hipersensibilidade mediada por ácido salicílico em células de *Rubus fruticosus***. 2010. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

PEREIRA, A. V. S. **Sensibilidade a fungicidas e adaptabilidade de *Lasiodiplodia theobromae* patogênico ao mamão**. 2009. 57 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, 2009.

PÉREZ-JIMÉNEZ J, SAURA-CALIXTO F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, p. 791-800, 2006.

PESTANA-BAUER, V. R.; ZAMBIAZI, R. C.; MENDONÇA, C. R. B., BENEITO-CAMBRA, M.; RAMIS-RAMOS, G. γ -oryzanol and tocopherol contents in residues of rice bran oil refining. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1479–1483, 2012.

RASOOLI, I.; ABYANEH, M. R. Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Food Control**, v. 15, n. 6, p. 479-483, 2004.

REYES-DOMINGUEZ, Y.; BOEDI, S.; SULYOK, M.; WIESENBERGER, G.; STOPPACHER, N.; KRŠKA, R.; STRAUSS, J. Heterochromatin influences the secondary metabolite profile in the plant pathogen *Fusarium graminearum*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, p. 39–47, 2012.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.J.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, P. C. **Propriedades biológicas do óleo das sementes de *Azadirachta indica*: investigação dos mecanismos de ação antioxidante e dos seus efeitos sobre a viabilidade celular**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do ABC, São Paulo, 2013.

ROGERS, E. J.; RICE, S. S. M.; NICOLOSI, R. J.; CARPENTER, D. R.; MCCLELLAND, C.A.; ROMANCZYK, L.J. Identification and quantification of γ -oryzanol components and simultaneous assessment of tocopherols in rice bran oil. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 70, n. 3, p. 301-307, 1993.

ROSSATO, S. B. **Potencial antioxidante e compostos fenólicos de pêssegos (*Prunus persica* L. Batsch)**. 2009. 48 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2009.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). **Comunicado técnico on line da Embrapa**, n. 125, 2006.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{•+}. **Comunicado técnico on line da Embrapa**, n. 128, 2007.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado técnico on line da Embrapa**. n. 127, 2007.

SÁ, P. G. S.; GUIMARÃES, A. L.; OLIVEIRA, A. P.; FILHO, J. A. S.; FONTANA, A. P.; DAMASCENO, P. K. F.; BRANCO, C. R. C. BRANCO, A.; SILVA ALMEIDA, J. R. G. S.; Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 33, n. 4, p. 561-566, 2012.

SAENJUM, C.; CHAIYASUT, C.; CHANSAKAOW, S.; SUTTAJIT, M.; SIRITHUNYALUG, B. Antioxidant and anti-inflammatory activities of gamma-

oryzanol rich extracts from thai purple rice bran. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 6, p. 1070-1077, 2012.

SAMAPUNDO, S.; DE MEULENAER, B.; OSEI-NIMOH, D.; LAMBONI, Y.; DEBEVERE, J.; DEVLIEGHERE, F. Can phenolic compounds be used for the protection of corn from fungal invasion and mycotoxin contamination during storage. **Food Microbiology**, v. 24, p. 465-473, 2007.

SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review of Entomology**. n. 35, p. 271-297, 1990.

SEUS, E. R. Otimização de método para a determinação de tricotecenos em amostras de trigo. 2014. Dissertação 122 f. (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2014.

SHAHIDI, F., JANITHA, P.K., WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SHUKLA, R.; SINGH, P.; PRAKASH, B.; DUBEY, N. K. Antifungal, aflatoxin inhibition and antioxidant activity of *Callistemon lanceolatus* (Sm.) Sweet essential oil and its major component 1,8-cineole against fungal isolates from chickpea seeds. **Food Control**, v. 25, p. 27-33, 2012.

SILVA, J. C. T.; JHAM, G. N.; OLIVEIRA, R. D. L.; BROWN, L. Purification of the seven tetranortriterpenoids in neem (*Azadirachta indica*) seed by counter-current chromatography sequentially followed by isocratic preparative reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 1152, n. 1, p. 203-210, 2007.

SILVA, A. G.; ROCHA, L. C.; CANNIATTI BRAZACA, S. G. Caracterização físico-química, digestibilidade protéica e atividade antioxidante de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 4, p. 591-598, 2009.

SILVA, J. L.; TEIXEIRA, R. N. V.; SANTOS, D. I. V.; PESSOA, J. O.; Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o crescimento in vitro de fitopatógenos. **Revista Verde**, v. 7, n. 1, p. 80-86, 2012.

SIMIC, M. G., JAVANOVIC, S. V. Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. In: HO, C.T., OSAWA, T., HUANG, T.M., ROSEN, R.T. **Food phytochemicals for cancer prevention**. Washington: American Chemical Society, 1994.

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

SOSPEDRA, I.; BLESAS, J.; SORIANO, J. M.; MAÑES, J. Use of the modified quick easy cheap effective rugged and safe sample preparation approach for the simultaneous analysis of type A- and B-trichothecenes in wheat flour. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 1437-1440, 2010.

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

SOUZA, M. M. **Potencial antifúngico, antioxidante e inibidor da síntese de aflatoxinas dos extratos fenólicos de *Chlorella sp.* e *Spirulina platensis***. 2012. Tese 163 f. (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2012.

SOUZA, M. M.; OLIVEIRA, M. S.; ROCHA, M.; FURLONG, E. B. Avaliação da atividade antifúngica de extratos fenólicos de cebola, farelo de arroz e microalga *Chlorella pyrenoides*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 680-685, 2010.

SOUZA, M. M.; PRIETTO, L.; RIBEIRO, A. C.; SOUZA, T. D.; BADIÁLE-FURLONG, E. Assessment of the antifungal activity of *Spirulina platensis* phenolic extract against *Aspergillus flavus*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1050-1058, 2011.

SOUZA, M. M.; ROCHA, M.; OLIVEIRA, M. S.; BADIÁLE-FURLONG, E. Avaliação das atividades antifúngica e antimicotoxina de extratos fenólicos de farelo de arroz. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 437-441, 2012.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **Revista Uopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263-269, 2012.

SUN, Y.; LI, H.; HU, J.; LI, J.; FAN, Y. W.; LIU, X. R.; DENG, Z. Y.; Qualitative and quantitative analysis of phenolics in *Tetragonia hemsleyana* and their antioxidant and antiproliferative activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 44, p. 10507-10515, 2013.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3. ed. Sunderland: Sinauer, 2002, 690p.

TIAN, J.; HUANG, B.; LUO, X.; ZENG, H.; BAN, X.; HE, J.; WANG, Y. The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand.-Mazz essential oil and its potential use as a food preservative. **Food Chemistry**, v. 130, n. 3, p. 520–527, 2012.

TORRES, A.; RAMIREZ, M. L.; ARROYO, M.; CHULZE, S.; MAGAN, N. Potential for control of growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* and *F.proliferatum* on irradiated maize grain using anti-oxidants. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, p. 319–324 2003.

VACLAVIK, L.; ZACHARIASOVA, M.; HRBEK, V.; HAJŠLOVA, J. Analysis of multiple mycotoxins in cereals under ambient conditions using direct analysis in real time (DART) ionization coupled to high resolution mass spectrometry. **Talanta**, v. 82, p 1950-1957, 2010.

VIEGAS JUNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**. v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

XU, Z.; GODBER, S. Comparison of supercritical fluid and solvent extraction methods in extracting γ -oryzanol from rice bran. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 77, n. 5, p. 547-551, 2000.

YAMAMOTO-RIBEIRO, M. M. G.; GRESPAN, R.; KOHIYAMA, C. Y.; FERREIRA, F. D.; MOSSINI, S. A. G.; SILVA, E. L.; FILHO, B. A. A.; MIKCHA, J. M. G.; JUNIOR, M. M. Effect of *Zingiber officinale* essential oil on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3147-3152, 2013.

ZACHARIASOVA, M.; LACINA, O.; MALACHOVA, A.; KOSTELANSKA, M.; POUŠTKA, J.; GODULA, M.; HAJŠLOVA, J. Novel approaches in analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals employing ultra performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 662, n. 1, p. 51–61, 2010.

ZHIMIN, X.; HUA, N.; GODBER, J. S. Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols, and γ -oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation

accelerated by 2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2077–2081, 2001.

ZIGONEANU, I.G.; WILLIAMS, L.; XU, Z.; SABLIOV, C.M. Determination of antioxidant components in rice bran oil extracted by microwave-assisted method. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 4910-4918, 2008.

ZULLAIKAH, S.; MELWITA, E.; JU, Y.H. Isolation of oryzanol from crude rice bran oil. **Bioresource Technology**, v. 100, n.1, p.299–302, 2009.

ANEXOS

ANEXO 1 - Consulta Pública nº 77, de 19 de outubro de 2005
Limites máximos residuais de azoxistrobina

ANEXO 2 - Consulta Pública nº 57, de 17 de julho de 2003
Limites máximos residuais de trifloxistrobina

ANEXO 3 - Limites máximos residuais de micotoxinas em alimentos

Resolução - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011

Resolução – RDC nº 59, de 26 de dezembro de 2013

ANEXO 4 – Determinações de glicosamina, ergosterol e atividade enzimática

**ANEXO 5 – Método de extração de micotoxinas - QuEChERS modificado
(VACLAVICK et al., 2010)**