



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

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO, ANTIOXIDANTE E INIBIDOR DA PRODUÇÃO DE
AFLATOXINA POR EXTRATOS FENÓLICOS DE *Chlorella* sp. E *Spirulina*
*platensis***

MICHELE MORAES DE SOUZA

Prof^a Dr.^a Eliana Badiale Furlong

Orientadora

Fevereiro, 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA DE ALIMENTOS
Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO, ANTIOXIDANTE E INIBIDOR DA PRODUÇÃO DE
AFLATOXINA POR EXTRATOS FENÓLICOS DE *Chlorella* sp. E *Spirulina*
*platensis***

MICHELE MORAES DE SOUZA
Eng^a de Alimentos

Tese apresentada para a
obtenção do título de
Doutor em Engenharia e
Ciência de Alimentos

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

RIO GRANDE – RS

2012

Aos meus pais, **Eliana** e **Reginaldo**.

Ao meu marido **Marcelo**, meu amor e companheiro.

À minha filha **Camila**, razão do meu viver.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que torceram por mim durante toda minha caminhada e em especial,

Aos meus pais, Eliana e Reginaldo, os grandes responsáveis pela minha formação como profissional e como pessoa. A vocês devo todas as palavras que possam existir de agradecimento e afeto, é difícil encontrar palavras pra agradecer duas pessoas que anularam os seus próprios sonhos para realização dos meus. Muito obrigada por tudo que fizeram e fazem por mim, e que um dia eu possa retribuir todo este amor que vocês dedicaram a mim, amo muito vocês.

Aos meus irmãos, Nando, Ticia e Cesar, obrigada por todo apoio, carinho e amizade e pela nossa união que será eterna.

Ao meu marido Marcelo, meu amigo, meu companheiro, meu grande parceiro. Muito obrigado por tudo que sempre fizeste por mim. Pela grande ajuda durante todo o trabalho e principalmente por ter compreendido minhas ausências e faltas nestes últimos anos além do amor incondicional em todos meus momentos de dificuldades. Te amo muito.

A minha querida filha Camila, a ti o meu pedido de desculpas por todas as vezes em que disse: “Agora não posso, estou escrevendo a tese e os artigos”. Sei que mesmo com a tua pouca idade compreendesse todos os finais de semana que precisamos ficar em casa para que este trabalho fosse concretizado. Muito obrigada pela filha maravilhosa que és e por existir em minha vida...te amo muito!

A minha orientadora Eliana, mais que minha “suprema” professora, minha amiga, um exemplo de dedicação e profissionalismo. Uma pessoa especial, que esta sempre disponível a nos ajudar, 24 horas por dia e 7 dias por semana. Obrigado por todos estes anos de convívio, pelas conversas, pelos conselhos, pelo carinho e principalmente por ter me acreditado em mim quando nem eu achava que fosse capaz de chegar até aqui. Que o teu caminho continue iluminado porque a Ciência de Alimentos precisa de você...Obrigada.

As minhas filhas de coração: Luciana, Anelise e Taiana, obrigada pela dedicação durante a realização de todo trabalho, pelo carinho, pela amizade, pelas preocupações comigo e por serem pessoas tão especiais. Desejo de coração que vocês tenham a mesma sorte que eu tive de encontrar filhas tão queridas, e saibam

que podem contar comigo pra tudo que precisarem por toda vida. Minha eterna gratidão, OBRIGADA!!!

A querida amiga Renata, uma pessoa muito especial que tive a sorte de conhecer, honesta, sincera e amiga, espero que a nossa amizade seja eterna. Te adoro muito.

A minha amiga Helen, minha companheira de padaria, obrigada pelos bons momentos que passamos juntas, pelas divertidas conversas e pela ajuda incondicional no HPLC, saibas que podes contar comigo para o que precisares.

As professoras Melissa, Susana, Janaina e Itaciara, por terem aceitado me ajudar e contribuir para a melhora deste trabalho e a Vivian, pesquisadora da EMBRAPA.

A Catarina, obrigada pelas gostosas conversas no msn, que ajudaram a passar o tempo durante a dissertação da tese, muita sorte nesta nova fase de nossas vidas.

A Jaque, obrigada pela ajuda, pela amizade e principalmente por ter me consolado nos meus momentos mais difíceis, me deixando chorar em seu ombro.

A Paula e a Katherine pela ajuda nos experimentos finais.

Aos amigos do laboratório que tive o prazer de conviver durante todo o trabalho: Priscila, Gabriela, Gini, Ana Paula, Larine, Fernanda, Cristiano, Tânia, Cristiana, Gregory, Fran, Nathali, Letícia, Adriana, Lidiane, Júlio, Ana e Meritaine, muito obrigada por tudo, e principalmente pela disposição em ajudar todas as vezes que precisei.

A Jesus, pela alegria contagiante e pela paciência com as minhas bagunças ..vou sentir muita falta de ti.

Ao Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da FURG pelas amostras de microalgas.

Aos professores, funcionários e amigos do curso de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos.

À Coodenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Enfim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta, para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	III
SUMÁRIO	V
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
CAPÍTULO I	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo Geral	4
2.2 Objetivos específicos.....	4
CAPÍTULO II	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1 Fungos	6
3.1.1 Gênero <i>Aspergillus</i>	7
3.1.2 Gênero <i>Rhizopus</i>	8
3.2 Contaminação dos alimentos por fungos e micotoxinas	9
3.3 Micotoxinas	10
3.3.1 Aflatoxinas	12
3.4 Determinação da atividade antifúngica	12
3.5 Quantificação de biomassa fúngica.....	14
3.5.1 Uso do ergosterol como Medida de Biomassa Fúngica.....	15
3.5.2 Uso da glicosamina como Medida de Biomassa Fúngica	16
3.6 Compostos fenólicos	16
3.6.1 Métodos de análise	19
3.7 Agentes antifúngicos	21
3.8 Mecanismo de ação dos compostos inibidores do crescimento fúngico.....	25
3.9 Atividade antioxidante	25
3.10 Microalgas	28
3.10.1 <i>Chlorella</i>	30
3.10.2 <i>Spirulina platensis</i>	31
CAPÍTULO III	34
4. DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	35
ARTIGO 1.....	36
Determinação de ergosterol e glicosamina para estimativa de biomassa de <i>Rhizopus oryzae</i> e <i>Aspergillus flavus</i>	37
RESUMO	37
ABSTRACT	38
1. INTRODUÇÃO	39
2. MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1 Micro-organismos	41
2.2 Determinação da temperatura ótima de crescimento através da medida do crescimento radial de <i>Rhizopus oryzae</i> e <i>Aspergillus flavus</i>	41
2.3 Determinação da biomassa seca do micélio	41

2.4 Determinação de ergosterol	41
2.5 Determinação de glicosamina	42
2.6 Análise estatística	43
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4. CONCLUSÃO	51
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ARTIGO 2.....	55
Inibição da produção de biomassa <i>Rhizopus oryzae</i> na presença de extratos fenólicos de <i>Spirulina platensis</i> e <i>Chlorella</i> sp.	56
RESUMO	56
ABSTRACT	57
1. INTRODUÇÃO	58
2. MATERIAL E MÉTODOS	59
2.1 Procedimentos experimentais gerais	59
2.2 Micro-organismos	59
2.3 Estudo das condições de extração dos compostos fenólicos totais (CFT) das microalgas.....	60
2.4 Teste de atividade antifúngica	61
2.5 Quantificação da biomassa fúngica.....	62
2.5.1 Determinação da biomassa seca do micélio	62
2.5.2 Determinação de ergosterol.....	62
2.5.3 Determinação de glicosamina.....	62
2.6 Análise estatística.....	63
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4. CONCLUSÃO	72
5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	72
ARTIGO 3.....	75
Avaliação da atividade antifúngica de extrato fenólico de <i>Spirulina platensis</i> contra <i>Aspergillus flavus</i>	76
RESUMO	76
ABSTRACT	77
1. INTRODUÇÃO	78
2. MATERIAL E MÉTODOS	79
2.1 <i>Spirulina platensis</i> e preparação dos extratos fenólicos	79
2.2 Micro-organismo.....	80
2.3 Efeito <i>in vitro</i> dos extratos fenólicos no desenvolvimento fúngico	80
2.4 Determinação da biomassa seca do micélio	81
2.5 Determinação da glicosamina	81
2.6 Determinação do conteúdo de ergosterol.....	82
2.7 Determinação de proteínas	82
2.8 Análise estatística.....	82
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
4. CONCLUSÃO	87
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
ARTIGO 4.....	92
Atividade antioxidante <i>in vitro</i> de extratos fenólicos das microalgas <i>Spirulina platensis</i> e <i>Chlorella</i> sp.	93

RESUMO	93
ABSTRACT	94
1. INTRODUÇÃO	95
2. MATERIAL E MÉTODOS	97
2.1 Solventes, reagentes e soluções	97
2.2 Microalgas	97
2.3 Caracterização físico-química das microalgas	97
2.4 Extração dos compostos fenólicos	98
2.5 Determinação da atividade antioxidante (ensaio <i>in vitro</i>)	99
2.5.1 Atividade de sequestro do radical DPPH	99
2.5.2 Inibição da oxidação catalisada enzimaticamente	100
2.5.3 Inibição da peroxidação lipídica	100
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
4. CONCLUSÕES	107
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
ARTIGO 5	111
Atividade antiaflatoxina de compostos fenólicos naturais da <i>Spirulina platensis</i>	112
RESUMO	112
ABSTRACT	113
1. INTRODUÇÃO	114
2. MATERIAL E MÉTODOS	115
2.1 <i>Spirulina platensis</i> e cultivo	115
2.2 Extração de fenóis ácidos da <i>Spirulina platensis</i>	116
2.3 Perfil de compostos fenólicos	116
2.4 Ensaio de atividade antifúngica	119
2.5 Determinação de aflatoxinas	120
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	122
3.1 Perfil dos fenóis no extrato metanólico de <i>Spirulina platensis</i>	122
3.2 Ensaio de atividade antifúngica e antiaflatoxina	126
4. CONCLUSÃO	133
5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	133
CAPITULO IV	138
5. CONCLUSÕES GERAIS	139
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	140
ANEXO 1	162

LISTA DE TABELAS

CAPITULO III – Artigo 1

Tabela 1: Biomassa seca (gramas) de <i>Rhizopus oryzae</i> e <i>Aspergillus flavus</i>	45
Tabela 2: Indicativos de eficiência dos métodos de determinação de glicosamina e ergosterol.....	46
Tabela 3: Correlações entre massas secas (g) e os conteúdos de ergosterol e glicosamina (mg) para o <i>Rhizopus oryzae</i> e <i>Aspergillus flavus</i>	50

CAPITULO III – Artigo 2

Tabela 1: Matriz do planejamento fatorial (DCC) com valores codificados (reais) e respostas obtidas para o conteúdo de fenóis totais ($\mu\text{g}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{microalga}}$).....	64
Tabela 2: Efeitos e coeficientes para as variáveis obtidas pelo tratamento estatístico para a <i>Spirulina platensis</i> e <i>Chlorella</i> sp.	65
Tabela 3: ANOVA do planejamento experimental para o extrato fenólico de <i>Spirulina platensis</i>	66
Tabela 4: ANOVA para planejamento experimental para o extrato fenólico de <i>Chlorella</i> sp.	66
Tabela 5: Biomassa (gramas) de <i>Rhizopus oryzae</i> durante os experimentos.	69
Tabela 6: Inibição do <i>Rhizopus oryzae</i> (%) pelo conteúdo de glicosamina e ergosterol.	71

CAPITULO III – Artigo 3

Tabela 1 – Biomassa fúngica (gramas) <i>Aspergillus flavus</i> durante os experimentos.....	84
Tabela 2 – Componentes da biomassa fúngica durante os experimentos.	85

CAPITULO III – Artigo 4

Tabela 1: Composição proximal das microalgas.	102
Tabela 2: Concentração de fenóis totais dos extratos das microalgas e a % de DPPH consumido.	103
Tabela 3: Índices de peróxido ($\text{meq}_{\text{peróxido}}/\text{kg}_{\text{amostra}}$) dos experimentos ao longo do armazenamento em presença ou não de extratos fenólicos.....	106

CAPITULO III – Artigo 5

Tabela 1: Programa do gradiente de eluição dos solventes para separação de compostos fenólicos em <i>Spirulina platensis</i>	118
Tabela 2: Descrição das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂ utilizadas.	120
Tabela 3: Faixa de tempos de retenção (t _R) e comprimentos de onda (λ_{max}) de absorção dos padrões de compostos fenólicos por CLAE –UV.....	123
Tabela 4: Curvas analíticas dos padrões de ácidos fenólicos.....	124
Tabela 5: Quantificação por CLAE do teor de fenóis individuais na microalga <i>Spirulina platensis</i>	125
Tabela 6: Condições cromatográficas para as micotoxinas AFAB ₁ , AFAB ₂ , AFAG ₁ e AFAG ₂	129
Tabela 7: Efeito do extrato fenólico de <i>Spirulina platensis</i> sobre a produção de aflatoxinas por <i>Aspergillus flavus</i>	131
Tabela 8: Porcentagem de inibição da produção de aflatoxinas por extrato de <i>Spirulina platensis</i>	132

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO II – Revisão Bibliográfica

Figura 1: Fotobiorreatores onde é realizado o cultivo de *Spirulina platensis* na planta de Santa Vitória do Palmar (Rio Grande do Sul)..... 33

CAPITULO III – Artigo 1

Figura 1: Variação da temperatura e a multiplicação radial de *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus flavus* em meio BDA. 44

Figura 2: Evolução do conteúdo de glicosamina (mg/g de biomassa seca) de *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus flavus* durante o intervalo de cultivo..... 46

Figura 3: Evolução do conteúdo de ergosterol (mg/g de biomassa seca) de *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus flavus* durante o intervalo de cultivo. 48

CAPITULO III – Artigo 2

Figura 1: Curva de contorno para CFT da *Spirulina platensis* 67

Figura 2: Curvas de contorno para CFT da *Chlorella* sp. 68

Figura 3: Conteúdo de glicosamina dos tratamentos com e sem a adição dos extratos fenólicos das microalgas..... 70

Figura 4: Conteúdo de ergosterol dos tratamentos com e sem a adição dos extratos fenólicos das microalgas..... 70

CAPITULO III – Artigo 3

Figura 1: Variação da taxa de crescimento da biomassa de *Aspergillus flavus* na ausência e na presença dos CFT..... 84

Figura 2: Inibição fungica pelo extrato de *Spirulina platensis*. 86

CAPITULO III – Artigo 4

Figura 1: Inibição da reação de escurecimento enzimático pelos extratos das microalgas. 105

CAPITULO III – Artigo 5

Figura 1: Cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado aos detectores de ultravioleta e fluorescência. 117

Figura 2: Cromatograma da mistura de padrões fenólicos nas condições do experimento. 123

Figura 3: Cromatograma dos compostos fenólicos em *Spirulina platensis* por CLAE com coluna em fase reversa e detector UV. 124

Figura 4: Efeitos das diferentes concentrações de extrato fenólico de *Spirulina platensis* no crescimento radial do *Aspergillus flavus*. Os valores são médias (n = 3) ± desvios padrão. 126

Figura 5: Porcentagem de inibição das diferentes concentrações de extrato fenólico sobre o desenvolvimento do *Aspergillus flavus*. 127

Figura 6: Zonas de inibição do extrato de *Spirulina platensis* (78 µg/mL) sobre *Aspergillus flavus* no 5º, 7º, 14º e 21º dia de incubação. 128

Figura 7: Cromatogramas das aflatoxinas G2, G1, B2 e B1..... 130

LISTA DE ABREVIATURAS

AFA B₁ – Aflatoxina B₁

AFA B₂ – Aflatoxina B₂

AFA G₁ – Aflatoxina G₁

AFA G₂ – Aflatoxina G₂

µL – microlitro

CCD – Cromatografia de Camada Delgada

CFT – compostos fenólicos totais

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE – UV – cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector Ultra Violeta

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilidrazila

FDA – Food Drug Administration

FES – Fermentação em Estado Sólido

FURG – Universidade Federal do Rio Grande

g – gramas

GRAS – Generally Recognized as Safe

h – hora

L – litro

LEB – Laboratório de Engenharia Bioquímica

m – metro

min – minutos

mL – mililitro

RPM – rotações por minutos

uA – unidades de absorvância

RESUMO

A contaminação fúngica acarreta alterações na qualidade nutricional e no valor econômico de produtos alimentícios podendo causar danos patológicos em plantas, animais e humanos. A identificação da atividade antioxidante, antifúngica e antimicotoxinas, em extratos de microalgas com propriedade de inibir a multiplicação de fungos e subsequente produção de micotoxinas abre a perspectiva de empregar substâncias mais eficientes e com maior ação específica contra estes microorganismos. Entre os compostos com propriedades inibidoras de radicais livres, de crescimento fúngico e produção de micotoxinas, destacam-se os compostos fenólicos, que podem inibir a atividade metabólica microbiana, dificultando a atividade de enzimas. Neste estudo foram avaliados o poder de inibição de multiplicação fúngica de *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus flavus* pelos extratos fenólicos de *Chlorella* sp. e *Spirulina platensis*, bem como sua atividade antioxidante, e a atividade antimicotoxinas da última microalga contra *Aspergillus flavus*. O conteúdo de fenóis totais foi em média 1000 $\mu\text{g}_{\text{fenóis}}/\text{g}$ *Spirulina platensis* e 600 $\mu\text{g}_{\text{fenóis}}/\text{g}$ *Chlorella* sp., sendo que o ácido gálico e o cafeico foram identificados como compostos majoritários na *Spirulina platensis*. As determinações de glicosamina (parede celular) e ergosterol (membrana celular) mostraram-se bons indicativos do desenvolvimento microbiano permitindo uma boa estimativa da inibição dele. O extrato fenólico de *Spirulina platensis* apresentou capacidade de inibir cerca de 50% a formação da parede e da membrana celular para ambos os fungos estudados e de 100% a produção de aflatoxina B₁ até o 10º dia de cultivo do *Aspergillus flavus*. Além disso, o extrato metanólico de *Spirulina platensis* inativou 53,5% o DPPH reativo, limitou o escurecimento enzimático ocasionado pela peroxidase em 55% e inibiu a peroxidação lipídica em 46% após 14 dias de armazenamento sob luz. Estes resultados mostram que a ação antifúngica, antimicotoxinas e antioxidante está naturalmente presente em alguns tecidos microbianos e que encontrar a forma de extraí-los e aplicá-los como conservantes alimentícios é muito promissor para substituição aos antifúngicos e outros conservantes químicos.

Palavras-chave: antifúngico, *Aspergillus flavus*, aflatoxinas, antioxidante, *Spirulina platensis*, *Chlorella* sp.

ABSTRACT

The fungal contamination leads to changes in nutritional quality and economic value of food may cause pathological damage in plants, animals and humans. The identification of antioxidant, antifungal and antimycotoxin in extracts of microalgae with property to inhibit the growth of fungi and subsequent mycotoxin production opens up the prospect of using substances more efficient and more specific action against these microorganism. Among the compounds with free radical inhibiting properties of fungal growth and production of mycotoxins, stand out phenolic compounds which can inhibit the metabolic activity of microbial enzyme activity difficult. This study evaluated the power of inhibiting the multiplication of fungal *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus flavus* by phenolic extracts of *Chlorella* sp. and *Spirulina platensis*, as well as its antioxidant activity and the activity of the last antimycotoxin microalgae against *Aspergillus flavus*. The content of phenolics averaged 1000 $\mu\text{g}_{\text{fenóis/g}}$ *Spirulina platensis* and 600 $\mu\text{g}_{\text{fenóis/g}}$ *Chlorella* sp., and gallic acid and caffeic been identified as major compounds in *Spirulina platensis*. Measurements of glucosamine (cell wall) and ergosterol (membrane) showed to be good indicators of microbial growth allowing a good estimate of inhibiting it. The extract phenolic *Spirulina platensis* showed a significant ability to inhibit about 50% the formation of the wall and cell membrane for both fungi studied and 100% the production of aflatoxin B₁ until the 10th day of cultivation of *Aspergillus flavus*. In addition, the methanol extract of *Spirulina platensis* inactivated 53.5% the DPPH reactive, limited the enzymatic browning caused by peroxidase in 55% and inhibited lipid peroxidation by 46% after 14 days of storage under light. These results show that the antifungal, and antioxidant antimycotoxin is naturally present in some microbial tissues and find a way to extract them and apply them as food preservatives is very promising for replacing the antifungal preservatives and other chemicals.

Key words: antifungal, aflatoxin, antioxidant, *Spirulina platensis*, *Chlorella* sp.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

O uso de defensivos agrícolas é justificado para eliminar pragas e melhorar a produtividade das lavouras. Entre outros, estas substâncias químicas previnem o desenvolvimento fúngico, e no caso de espécies toxigênicas, a produção de micotoxinas em produtos agrícolas e alimentos processados. Entretanto, o uso intensivo dos diferentes tipos de fungicidas vem trazendo consequências para o homem e meio ambiente, pela seleção de espécies, por desencadear a produção de micotoxinas em meios de cultura, ou por ocasionar danos crônicos à população, como vem demonstrando a literatura técnico científica (NAIDU, 2000; YOSHIZAWA, 2001; GALVÃO et al., 2003; EL-NAGERABI et al., 2012; TIAN et al., 2012).

Os órgãos públicos que regulamentam a saúde pública vem incentivando a disponibilização de compostos antimicrobianos que atendam as necessidades tecnológicas e garantam a qualidade dos alimentos. Para tal, agrotóxicos e conservantes mais eficientes e com menor toxicidade tem sido alvo de pesquisas, principalmente de agentes antifúngicos, a partir de classes químicas com mecanismos de ação diferentes dos atualmente disponíveis, visando limitar a seleção de espécies microbianas resistentes (BELEWA et al., 2011; PRAKASH et al., 2011; TIAN et al., 2012).

Os fungos toxigênicos podem, em qualquer período de seu desenvolvimento, produzir metabólitos secundários, as micotoxinas. Estas substâncias podem ser carcinogênicas, neurotóxicas e teratogênicas sendo sua ocorrência em alimentos mencionada em diferentes países, inclusive no Brasil e em muitos casos relacionadas com danos a saúde de humanos e animais de criação (NUNES et al., 2003; ABDULKADAR et al., 2004; AYCICEK et al., 2005; BITTENCOURT et al., 2005; HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2011).

A utilização de substâncias de origem vegetal e microbiana para combater a infecção de matérias-primas e alimentos, tornam o alimento mais atrativo ao consumidor pela inocuidade, mesmo quando empregadas em concentrações relativamente elevadas. Além dos benefícios proporcionados à saúde, em especial dos compostos fenólicos, alcaloides, terpenos, proteínas e outros, alguns apresentam propriedades funcionais, estes compostos podem atuar na inibição da biossíntese de componentes da parede celular como o glucan, a quitina, a glicosamina, o ergosterol e as manoproteínas, destruindo a membrana e dificultando a entrada de nutrientes ou inibindo a síntese de enzimas do metabolismo primário (PUUPPONEN-PIMIA et al.,

2001; SELVI et al., 2003; SOUZA et al., 2010; 2011; TIAN et al., 2012). O conhecimento da presença dos mesmos, além do impacto científico pode ser subsídio para o desenvolvimento de tecnologias que permitam o seu emprego para fins de produção de insumos alimentícios e medicamentos isentos de conservantes tóxicos. Dentre eles os mais conhecidos estão na classe dos compostos fenólicos que também podem atuar como antifúngicos e inibidores da produção de micotoxinas (OLIVEIRA & BADIALE-FURLONG, 2008), ou como antioxidantes naturais tornando-os uma alternativa para prevenir a deterioração oxidativa de alimentos (KAUR & KAPOOR, 2002; OLIVEIRA et al., 2007)

As microalgas têm sido objeto de numerosos estudos em países como Estados Unidos, Índia, China, Chile, Itália, Japão, França, Israel, Canadá, México, Austrália e Brasil pelo seu potencial para comercialização como nutracêuticos, onde a principal propriedade é a de prevenir processos oxidativos. As microalgas *Spirulina* e *Chlorella* são muito estudadas pois se desenvolvem em curto período de tempo, requerem cuidados simples de cultivo e estão associadas a uma série de alegações de funcionalidade comprovadas cientificamente, porém pouco se tem demonstrado sobre seu poder antifúngico e/ou inibidor da produção de micotoxinas por espécies toxigênicas (DERNER et al., 2006; PARISI et al., 2009; SOUZA et al., 2010; SOUZA et al., 2011). No caso do Brasil elas vêm sendo estudadas por grupos distribuídos em diversas regiões, e, especificamente na FURG, vêm sendo cultivadas no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) para uso em formulações de alimentos ou extração de biocompostos diversos, entre outros.

Quando comparadas aos vegetais superiores e aos animais, como fonte de produtos e nutrientes imprescindíveis para a qualidade de vida do homem, as microalgas levam grande vantagem devido à rapidez com que se reproduzem, facilidade de cultivo em zonas não apropriadas para a agricultura e à possibilidade de direcionar a cultura para a produção de vários compostos de interesse comercial tais como clorofila, vitaminas e compostos fenólicos a partir do controle das condições de cultivo.

O conhecimento da presença de substâncias que possuam atividade antifúngica, antimicotoxinas e antioxidantes nas duas microalgas mencionadas, nas condições de cultivo do LEB, abre a possibilidade de utilizá-las também para extração de compostos bioativos que possam ser empregados para substituir conservantes

químicos e antioxidantes sintéticos, além de reduzir os riscos de contaminação crônica por antifúngicos ou outros redutores sintéticos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar o potencial antifúngico e antioxidante dos extratos fenólicos de *Chlorella* sp. e *Spirulina platensis* e a capacidade de inibir a síntese de aflatoxinas da última.

2.2 Objetivos específicos

Padronizar metodologia para quantificar biomassa de *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus flavus*.

Padronizar metodologia de extração dos compostos fenólicos das microalgas *Spirulina platensis* e *Chlorella* sp.

Estudar a ação antifúngica e antioxidante dos extratos fenólicos das microalgas *Spirulina platensis* e *Chlorella* sp.

Estudar metodologia de separação e identificação dos compostos fenólicos da microalga *Spirulina platensis* além da avaliação de sua ação antimicotoxigênica.

CAPÍTULO II

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fungos

Fungos são micro-organismos heterotróficos aeróbios, altamente disseminados no meio ambiente. Algumas espécies são saprófitas e atuam decompondo a matéria orgânica, auxiliando a fertilização do solo, outras são patogênicas e ainda há as toxigênicas. São versáteis quanto ao tipo de substratos onde se desenvolvem, ocorrendo onde outros micro-organismos não o fazem (TANAWAKI & SILVA, 1996; PUTZKE & PUTZKE, 2002). Assim, são ubíquos encontrados no solo, vegetação e águas, podendo causar efeitos indesejáveis para a agricultura, recursos hídricos, indústria de alimentos e outras. Os fungos podem ser inativados ou retirados durante o processamento e estar ausentes nos produtos manufaturados mas em caso de ocorrência de espécies toxigênicas as toxinas permanecem estáveis (MOSS, 1992).

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

A reprodução dos fungos filamentos pode acontecer pelos esporos, que são germinados formando hifas, cujo crescimento é limitado na sua porção terminal. Um micélio apresenta diferentes estágios fisiológicos, uma vez que as hifas próximas a extremidade são as mais jovens que as do interior e a partir dela é que se dá o crescimento da colônia. As hifas de extremidade são proporcionalmente muito menores em relação à fração interna do micélio, portanto a proporção de biomassa nova em relação à massa total diminui com o tempo de cultura. No entanto, dependendo do tipo de cultivo, o crescimento dos fungos filamentos acontece de maneira diferenciada por crescimento radial nos cultivos em Ágar (PALMA, 2003).

Fisiologicamente, os fungos se adaptam a sobrecargas mais severas que a maioria dos micro-organismos, podendo crescer em substratos com alta concentração de açúcar, uma vez que são pouco sensíveis a altas pressões osmóticas; toleram pH entre 2,0 e 9,0, enquanto o pH ótimo para a maior parte das espécies é em torno de 5,6. A maioria das espécies fúngicas se desenvolvem numa temperatura ótima de 22-30 °C, porém algumas se desenvolvem entre 35 e 37 °C e os psicrófilos crescem bem

à temperatura de refrigeração (PUTZKE & PUTZKE, 2002; ESPOSITO & AZEVEDO, 2004).

Em vista das características para a produção de biomassa fúngica, eles podem ser cultivados ou empregados para degradar uma ampla variedade de componentes vegetais complexos, sendo que os gêneros mais promissores para a produção de biomassa são o *Rhizopus*, *Aspergillus* e *Mucor* (ANUPAMA & RAVINDRA, 2000).

3.1.1 Gênero *Aspergillus*

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

Espécies desse gênero são economicamente importantes, pois são utilizadas em numerosas fermentações, incluindo a produção de ácidos cítrico e glutâmico pelo *Aspergillus niger*, que também é citado como o micro-organismo mais usado para enriquecimento proteico de substratos. No Japão, *Aspergillus wentii* é utilizado para produção de alimentos fermentados (GREWAL & KALRA, 1995; SCHIRICKX et al., 1995; WAINWRIGHT, 1995; HAQ et al., 2003).

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

Os fungos da espécie *Aspergillus*, principalmente o *A. flavus*, produzem grande quantidade de esporos vegetativos, que rapidamente são dissipados por correntes de ar. O *A. flavus* é cosmopolita na natureza, podendo ser isolado de qualquer lugar, tanto

de ambientes internos como ao ar livre. Também é suspeito de ser um dos agentes responsáveis por uma variedade de reações alérgicas incluindo asma alérgica, rinite e aspergilose broncopulmonar (ADHIKARI et al., 2004). Os esporos de fungos são pequenos (menor que 10 μ m), leves, podendo ser inalados e se estabelecer em espaços aéreos pequenos nas vias aéreas inferiores dos pulmões (BELEWA et al. 2011). A espécie *A. flavus* apresenta colônias caracteristicamente verdes a amarelo-oliva, eventualmente pode se apresentar amarelo puro ou acinzentadas com o tempo de cultivo.

A grande importância do *Aspergillus flavus* se deve ao fato deste ser produtor de micotoxinas sendo conhecidas como aflatoxinas. O *A. flavus* pode se desenvolver em um amplo espectro de temperatura, entre 6 a 45 °C. O crescimento deste fungo pode acontecer com umidade relativa de 86-87%, e atividade de água (Aa) mínima de 0,78 a 0,80, sendo a ideal entre 0,95-0,97 (RAMAKRISHNA et al., 1993). Para a produção de micotoxinas, a Aa ideal é em torno de 0,83 a 0,87 e temperatura de 27 °C, estes fatores o tornam um contaminante típico de armazenamento. Estas condições abióticas são comuns em países tropicais, o que favorece a contaminação de grãos no Brasil, América Central, África Equatorial, Países da Ásia e outros.

3.1.2 Gênero *Rhizopus*

Estes fungos são classificados como zigomicetos, da ordem dos *Mucorales* e são considerados os mais primitivos dentro do reino (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004). As hifas são contínuas, formando uma massa citoplasmática multinucleada (hifas cenocíticas) e sem corpo de frutificação. Durante a reprodução assexuada algumas hifas crescem na vertical e se diferenciam na extremidade, formando esporângios, estruturas constituintes dos esporos. Os esporângios são grandes e negros; quando maduros se desintegram liberando os esporos que germinam e formam novas massas de hifas (RAVEN et al., 1996). As colônias possuem aparência de algodão, tornando-se escuras com o tempo, possuindo um micélio vegetativo contínuo ramificado, em parte imerso no substrato, em parte aéreo. O micélio encontra-se conectado às estruturas de reprodução assexuada (ALBUQUERQUE, 2003).

O gênero *Rhizopus* apresenta crescimento rápido em diversos ambientes como solos e vegetais, especialmente naqueles contendo açúcares solúveis e amido, o que os caracteriza como glicófilos e os associa ao apodrecimento de frutas.

A reprodução sexuada, menos frequente ocorre com a aproximação de duas hifas de indivíduos diferentes. As extremidades dessas hifas se encostam e se

fundem, originando um zigoto de parede espessa e resistente, denominado zigospóro. Este, passado o período de dormência, sofre meiose e germina, originando um novo micélio (RAVEN et al., 1996). Este gênero não possui espécies toxigênicas, fato que pode justificar a grande facilidade de contaminação de materiais onde eles se desenvolvem por outras espécies fúngicas (ALBUQUERQUE, 2003).

Historicamente, o gênero *Rhizopus*, tem sido empregado na fermentação do *Tempeh* fabricado a partir de soja. Este fungo também é usado para produção de queijos e ácidos orgânicos (RUENGRNGUGLIKIT & HANG, 2003). Algumas espécies, como *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus oligosporus* e *Rhizopus stolonifer* também podem produzir enzimas como fitases, lipases e glicoamilases entre outras, principalmente utilizando resíduos agroindustriais como substrato sólido para seu desenvolvimento.

3.2 Contaminação dos alimentos por fungos e micotoxinas

Apesar das utilidades e benefícios do emprego dos fungos, em processos industriais diversos, quando estes contaminam os produtos alimentícios podem representar perigo à saúde pública, pois além de diminuir a disponibilidade de nutrientes, alteram as características sensoriais e podem produzir substâncias tóxicas (MENEZES, 1992; KUMAR et al., 2010).

Os fungos são agentes biológicos oportunistas, de natureza ubíqua que colonizam os alimentos por causa de sua capacidade de produzir enzimas hidrolíticas que degradam os componentes dos alimentos levando a perdas nutricionais e econômicas (DE SOUZA et al., 2005). Dentre as espécies fúngicas toxigênicas encontradas nos alimentos destacam-se os gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Estes três grupos são classificados em função do habitat e substrato preferencial para o seu desenvolvimento. Enquanto as espécies de *Fusarium* são patógenas destrutivas das plantas, produzindo micotoxinas antes ou imediatamente após a colheita, espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* são mais comumente encontradas como contaminantes de equipamentos e alimentos durante a secagem e posterior estocagem (SWEENEY & DOBSON, 1998).

O *Aspergillus flavus*, por exemplo, é um dos grandes responsáveis por diminuir a vida útil de produtos alimentícios, além de ser produtor de aflatoxinas. Assim, a contaminação dos alimentos, com fungos e a presença de aflatoxina é uma grande preocupação, que tem recebido atenção mundial devido aos seus efeitos deletérios sobre a saúde humana e animal, bem como sua importância no comércio internacional de alimentos (SOUBRA et al., 2009).

Muitos autores destacam o fato de que os aspectos relacionados a deterioração de matérias-primas e produtos, e a produção de toxinas justificam a necessidade de detectar, quantificar e identificar fungos em alimentos para garantir a qualidade e diminuir o risco de deterioração ou de produção de toxinas fúngicas (TANAWAKI et al., 1999). Porém a quantificação da multiplicação fúngica é bastante complexa, considerando que os fungos se desenvolvem através de hifas e não como células simples, e que o micélio pode penetrar nos substratos sólidos fazendo com que as tendam a se espalhar, tornando difícil a quantificação em placas.

O potencial toxigênico de produção de micotoxinas pode ser estimado pelo isolamento de espécies de gêneros suspeitos inoculados em meios contendo nutrientes e condições de temperatura e umidade adequadas para a sua produção ou pela detecção da micotoxina na matriz onde o micro-organismo é cultivado (OSBORNE, 1982).

Em estudo da micota e de espécies aflatoxigênicas em derivados de arroz, Lima et al. (2000), avaliaram a capacidade de produção de micotoxinas por cepas de *Aspergillus flavus*, isoladas de arroz e derivados. Os micro-organismos foram inoculados em ágar contendo leite de coco e incubados por 7 dias a 25 °C. A determinação das micotoxinas realizadas em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) revelou que 53% das cepas foram aflatoxigênicas e produziram aflatoxinas B₁ e B₂. Nunes et al. (2003) avaliaram o potencial toxigênico de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* isoladas de amostras de arroz, produtoras de aflatoxina B₁ e ocratoxina A, respectivamente, sendo a última produzida quando o farelo de arroz foi utilizado como substrato.

3.3 Micotoxinas

A contaminação dos alimentos por fungos depende da infestação que os mesmos podem ocasionar no campo, durante e após a colheita, transporte, processamento e armazenamento do produto (SABINO, 1996). O estresse, o desbalanço de nutrientes e as condições ambientais propiciam a seleção de espécies toxigênicas que em condições específicas produzem micotoxinas, metabólitos secundários produzidos em alguma etapa do desenvolvimento microbiano, consideradas tóxicos aos animais e ao homem (SWEENEY & DOBSON, 1998).

Pode-se assumir que aproximadamente 20% dos produtos alimentícios (principalmente de origem vegetal) estão substancialmente contaminados por micotoxinas. Algumas das mais frequentes micotoxinas detectadas em produtos

alimentícios e rações animais originários de diferentes países são a aflatoxina B₁ e a ocratoxina A. Do total de 300 micotoxinas que vem sendo descritas, produzidas por cerca de 200 espécies de fungos, apenas 20 são normalmente encontradas em alimentos e rações em níveis considerados de risco para a saúde humana e animal (ANKLAM et al., 2002).

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

A maioria das micotoxinas são tóxicas em pequenas concentrações e requerem métodos sensíveis e confiáveis para a sua detecção. Os métodos analíticos para a determinação de micotoxinas normalmente são constituídos por etapas de extração, limpeza, separação, detecção, quantificação e confirmação. As etapas diferem quanto os tipos de equipamentos utilizados, reagentes disponíveis e dos requerimentos analíticos (sensibilidade, exatidão, precisão, tempo e custo operacional) (WELKE et al., 2010).

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) além dos métodos imunoensois (ELISA e radioimunoensaio) (MALLOZZI & CORRÊA, 1998).

O método oficial descrito na Association of Official Analytical Chemists (AOAC) para análise quantitativa de micotoxinas envolve a determinação por CLAE 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 (GUIMARÃES & COLLINS, 1993; FURLANI et al., 1999; POPPI et al., 2007).

O uso de CLAE oferece como vantagens a versatilidade, ter como único requisito a solubilidade da amostra na fase móvel, alta resolução, boa detectabilidade com desvios de detecção menores que 5%. As desvantagens são alto custo do

equipamento e manutenção interface entre os diferentes componentes e experiência do operador (SYDENHAM & THIEL, 1996).

3.3.1 Aflatoxinas

São conhecidas 18 diferentes moléculas do grupo das aflatoxinas, sendo a aflatoxina B₁ (AFB₁) considerada a mais tóxica, seguida da aflatoxina G₁ (AFG₁), aflatoxina B₂ (AFB₂) e aflatoxina G₂ (AFG₂). As aflatoxinas são biossinteticamente consideradas bisfurano cumarinas derivadas de decacetídeos. São compostos heterocíclicos distinguíveis cromatograficamente por apresentarem fluorescência azul (série B) ou verde (série G) quando submetidas a radiação ultravioleta de comprimento de onda longo. Estas moléculas apresentam baixo peso molecular, de 312 a 330 g/mol, sendo altamente solúveis em compostos de polaridade intermediária e pouco solúveis em água.

Na saúde pública as aflatoxinas são identificadas como fatores envolvidos na etiologia do câncer hepático no homem, como consequência da ingestão de alimentos contaminados. Uma das causas da extrema toxicidade da AFAB₁ é a sua rápida absorção pelo sistema gastrointestinal, o que facilita a entrada na circulação sanguínea e seu transporte para o fígado, principal sítio de biotransformação.

Os efeitos tóxicos das aflatoxinas são dependentes da dose e do tempo de exposição, determinando se a intoxicação será aguda ou crônica. A síndrome tóxica aguda ocorre pela ingestão de alimentos com alta concentração de aflatoxina, sendo os efeitos observados em curto intervalo de tempo.

3.4 Determinação da atividade antifúngica

Rotineiramente para medir a atividade antimicrobiana de alimentos, os testes são classificados em dois tipos: *in vitro* e de aplicação. Os primeiros também são chamados de métodos de triagem, amplamente utilizados onde os compostos são aplicados para produzir informações preliminares para estimar o potencial de uso do composto teste. O segundo tipo inclui testes, onde um antimicrobiano é aplicado diretamente em um produto alimentício (DAVIDSON & PARISH, 1989). Nos testes descritivos, o micro-organismo também é submetido ao antimicrobiano, mas amostras periódicas são conduzidas para determinar mudanças no número de células viáveis com o passar do tempo. Os testes descritivos fornecem informação sobre o efeito do composto na dinâmica de crescimento do micro-organismo.

Existem também os ensaios bioautográficos que são aqueles que empregam placas de cromatografia de camada delgada (CCD) para a análise. Os compostos separados por CCD são colocados em placas de ágar previamente inoculadas com o micro-organismo teste. Zonas de inibição de crescimento microbiano indicam a presença de substâncias antimicrobianas (RASOOLI & ABYANEH, 2004).

A avaliação da atividade antifúngica de compostos extraídos de fontes naturais como ervas, plantas medicinais, especiarias, frutas e vegetais tem sido realizada utilizando o teste de ágar difusão, onde discos de papéis são impregnados com o extrato teste e colocados sobre um meio de crescimento já inoculado com o micro-organismo. O tempo de incubação depende do fungo que está sendo submetido (VENTURINI et al., 2002; ARAÚJO et al., 2003; RASOOLI & ABYANEH, 2004) ou também bactéria (RAUHA et al., 2000). O teste de ágar diluído pode ser realizado com o extrato natural ou composto ao meio de crescimento, adicionando ao meio o fungo, inoculado a partir de uma solução de esporos ou um disco de meio com um micélio de fungo para avaliar o crescimento radial (QUIROGA et al., 2001; VÁSQUEZ et al., 2001; DEL RÍO et al., 2003; NGUEFACK et al., 2004). O inóculo pode ser espalhado no meio de crescimento, sendo a avaliação realizada a partir do número e tamanho das colônias desenvolvidas. Este teste é usado para determinar a concentração mínima de inibição, na qual o crescimento visual não é detectado, ou a concentração mínima fungicida, na qual a inibição é permanente (SÁNCHEZ et al., 2004; YIN & TSAO, 1999).

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

O método de diluição em meio líquido é o que apresenta procedimento mais complicado, entretanto é o mais sensível. Este método é recomendado na determinação da MIC. A MIC é a menor concentração do agente antimicrobiano capaz de inibir completamente o crescimento do micro-organismo em tubos ou placas de

microdiluição. Concentrações decrescentes do agente antimicrobiano são colocadas em tubos ou placas de microtítulo com poços contendo meio de cultura, com o inóculo padronizado, sendo em seguida, incubados. As placas de microtítulo têm a vantagem de nelas poderem ser testadas três ou mais concentrações de uma mesma substância e diferentes micro-organismos (RIOS et al., 1988).

3.5 Quantificação de biomassa fúngica

Os métodos acurados e confiáveis para medida de biomassa fúngica são essenciais para funções que dependem do aspecto quantitativo tais como: decomposição, ciclos de nutrientes, cadeia alimentar e agregação do solo. O monitoramento do desenvolvimento fúngico pode ser feito por métodos biológicos, químicos ou imunológicos. Os métodos para estimativa de biomassa fúngica incluem o uso de componentes bioquímicos específicos das células fúngicas, tais como: quitina, ergosterol, ácidos fosfolipídicos, medidas de atividade metabólicas (inibição seletiva de respiração), contagem direta e contagem por microscopia. Existem ainda técnicas como a coloração de hifas ativas por diacetato de fluoresceína (GRANT & HARVEY, 1982) e o método de detecção de enzimas extracelulares ligadas ao crescimento. Ruzicka et al. (2000) afirmam que a medida da concentração do ergosterol em substratos naturais é, sem dúvida, o mais eficiente método para estimar a biomassa fúngica.

Segundo Ooijkaas et al. (1998) todos os métodos para quantificação de biomassa fúngica, utilizados com mais frequência nas fermentações em estado sólido (FES), apresentam suas próprias limitações. Além disso, o conteúdo dos diferentes componentes celulares dos micro-organismos, especialmente os fungos, pode mudar significativamente dependendo da espécie, condições de crescimento e do intervalo de cultivo.

Muitas técnicas foram desenvolvidas para quantificação da biomassa fúngica, dentre elas utilizou-se a quantificação do biovolume fúngico através de microscopia direta para medição das hifas. Apesar de largamente utilizada, esta técnica pode subestimar ou superestimar a análise, uma vez que se avalia o biovolume fúngico através da fragmentação do substrato e do micélio por diferentes métodos, como centrifugação, que pode liberar apenas partes do micélio ou pode liberá-lo com pedaços de hifas inviáveis que, ao serem visualizadas em microscópio, podem ser medidas e quantificadas junto ao volume total de micélio viável (NEWELL et al., 1988).

3.5.1 Uso do ergosterol como Medida de Biomassa Fúngica

O ergosterol, principal esterol fúngico, é um dos componentes da membrana plasmática dos fungos. O principal caminho para a produção do ergosterol é seu precursor, a Acetil-CoA. Todos os esteróis são produzidos pela mesma via básica: com o ácido mevalônico condensando em unidades de isopreno, várias delas reunindo-se e sofrendo ciclização e diferentes substituições. A importante etapa da via de produção do ergosterol é a remoção de um grupamento metil de um carbono na posição C-14. Essa etapa é catalisada por uma enzima, C-14 demetilase, a qual apresenta um citocromo, como grupo prostético, contendo um átomo de ferro, (DEACON, 1998).

Diferente dos esteróis das plantas superiores, como o sitosterol, o ergosterol pode ser identificado e quantitativamente estimado, tanto por espectrofotometria (MARTIN et al., 1990), quanto por CLAE, utilizando um detector de ultravioleta em comprimento de onda de 282 nm (GALVÃO et al., 2003).

O ergosterol é considerado um bom indicador de crescimento fúngico, pois proporciona uma boa correlação com a biomassa metabolicamente ativa do fungo, uma vez que é um componente da membrana citoplasmática, o que vem motivando vários autores a utilizarem a quantificação do ergosterol como medida de biomassa fúngica (DAVIS & LAMAR, 1992; RUZICKA et al., 2000; GALVÃO et al., 2003)

A técnica de quantificação da molécula de ergosterol para determinação da biomassa fúngica foi desenvolvida para avaliar a contaminação de grãos armazenados (SEITZ et al., 1979), posteriormente foi aplicada em solos e lodo ativado (GESSNER & SCHWORBEL, 1991).

Os principais métodos de determinação do ergosterol envolvem três estágios: extração da amostra, separação do extrato e análise por cromatografia líquida ou por espectrofotometria. Dependendo do substrato, diferentes processos podem ser usados para a extração do ergosterol, ele pode, por exemplo, ser extraído de grãos de cereais invadidos por fungos pela homogeneização em metanol, sendo esse método aplicado em cereais, milho e soja. Outro exemplo é a extração por saponificação direta em solução alcoólica de hidróxido de potássio, sendo esse método aplicado para extração do ergosterol em raízes e solos contaminados com fungos (DAVIS & LAMAR, 1992; GALVÃO et al., 2003).

3.5.2 Uso da glicosamina como Medida de Biomassa Fúngica

O método de dosagem do conteúdo de glicosamina tem por princípio a quantificação de um constituinte majoritário da parede celular dos fungos, a quitina, um polímero linear insolúvel, constituído por ligações α -1,4 de acetilglicosamina. O método de dosagem do monômero baseia-se na despolimerização da molécula de quitina, seguida pelo ensaio, por espectrofotometria, da quantidade de glicosamina liberada (AIDOO et al., 1981; DEGRANGES et al., 1991; TOMASELLI-SCOTTI et al., 2001). A glicosamina é um bom indicador do desenvolvimento da biomassa fúngica, porém a concentração de nutrientes nos meios deve ser otimizada de acordo com cada caso. Além disso, a glicosamina é utilizada como um indicador de crescimento, uma vez que está presente nos fungos e não é encontrada em materiais vegetais comumente utilizados como substratos na FES.

Em seu trabalho experimental Degranges et al. (1991) avaliaram o teor de biomassa pela análise da glicosamina como constituinte celular. A análise foi efetuada em duas etapas: hidrólise e extração. Os dados mostraram que a glicosamina apresentou comportamento constante, mas a análise deste constituinte foi influenciada pelo meio de cultivo.

Scotti et al. (2001) estudaram a medida da glicosamina como método indireto para determinação do crescimento de *Cunninghamella elegans*, cultivada em FES, e concluíram que esta metodologia é adequada para a estimativa da biomassa fúngica. Os autores constataram que o conteúdo de glicosamina manteve-se constante, independentemente do intervalo e das condições de cultivo, mas pareceu ser dependente da composição do meio, especialmente da natureza da fonte de carbono.

Os trabalhos produzidos por Gelmi et al. (2000; 2002) mostram a validade da dosagem de glicosamina como método indireto para a estimativa da biomassa microbiana de *Gibberella fujikoroi*, na produção de ácido giberélico em FES.

3.6 Compostos fenólicos

Quimicamente, os fenóis são definidos como substâncias que possuem anel aromático, com um ou mais grupos substituintes hidroxílicos, incluindo seus derivados funcionais (ésteres, metil ésteres, glicosídeos, etc). A natureza dos polifenóis varia desde moléculas simples como os ácidos fenólicos até compostos altamente polimerizados, como os taninos. Nas plantas se apresentam na forma conjugada com um ou mais resíduos de açúcar unidos aos grupos hidroxílicos, ainda que em alguns

casos possam ser produzidas uniões diretas entre uma molécula de açúcar e um carbono aromático. A forma mais comum de encontrá-los na natureza é na forma de glicosídeos, sendo solúveis em água e solventes orgânicos (MARTINEZ-VALVERDE et al., 2000; ANGELO & JORGE, 2007).

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

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

Sob a denominação "compostos fenólicos" há mais de 4000 compostos divididos em 12 subclasses. Os compostos fenólicos constituem um grupo de substâncias químicas, considerados metabólitos secundários das plantas, com diferentes estruturas químicas e atividades. A distribuição dos compostos fenólicos nos tecidos e células vegetais varia de acordo com espécie e tipo de função a exercer, situando-se no interior de células ou na parede celular (MARTINEZ-VALVERDE et al., 2000). Alguns deles são muito importantes para suas funções fisiológicas, outros são usados para defesa em situações de estresse ou para atrair ou inativar outros organismos. No início de 1960, compostos fenólicos foram considerados como produtos metabólicos que ficavam armazenados no vacúolo de plantas.

As funções bioativas são exercidas por estruturas fenólicas variadas, como os ácidos fenólicos, derivados da cumarina, ligninas, taninos, flavonoides, alcaloides e terpenoides (SANTOS & FREITAS, 2003), que podem atuar como agentes redutores, sequestrantes de radicais livres, quelantes de metais ou desativadores do oxigênio

singlete e/ou exibir, simultaneamente, mais de uma destas funções (MELO e GUERRA, 2002).

Em alimentos, este tipo de estrutura pode constituir a base de pigmentos, antioxidantes, precursores de aromas. E, além destes efeitos físicos, atualmente se associa sua presença à promoção da saúde por sua capacidade de diminuir os níveis de açúcar no sangue, redução do peso corporal, anticarcinogenicidade, antiinflamatórios (BERNAL et al., 2011) antifúngica (SOUZA et al., 2010; 2011). No entanto, a grande maioria dos estudos envolvendo atividade biológica de compostos fenólicos enfatizam as ações antioxidantes (BERNAL et al., 2011).

Alguns compostos fenólicos de origem vegetal podem estar envolvidos no metabolismo primário durante o desenvolvimento normal da planta ou em resposta a condições de estresse para proteção dos constituintes das células contra radiação UV, injúrias e infecções (NACZK & SHAHIDI, 2004). Também contribuem para a resistência mecânica da parede celular, exercem papel regulatório no crescimento do vegetal e atuam durante a morfogêneses em resposta ao estresse e a ação de patógenos. A atividade antimicrobiana dos compostos fenólicos é indicada pelo seu papel na promoção da resistência das plantas a doenças, quando atuam interferindo com a integridade da membrana celular microbiana ou inibindo a germinação dos esporos (ANTOLOVICH et al., 2002; MARTINEZ-VALVERDE et al., 2000; NACZK & SHAHIDI, 2004).

Os compostos fenólicos presentes nas microalgas são os ácidos fenólicos, que estão reunidos em dois grupos: derivados do ácido hidroxicinâmico e derivados do ácido hidroxibenzóico. Os derivados do ácido hidroxicinâmico são compostos fenólicos de ocorrência natural que possuem um anel aromático com uma cadeia carbônica, constituída por 3 carbonos ligada ao anel. Os ácidos p-cumárico, ferúlico, cafeico e sináptico são os hidroxicinâmicos mais comuns na natureza. Estes ácidos existem nas plantas, usualmente na forma de ésteres, a exemplo do ácido clorogênico, éster do ácido quínico, cuja molécula é constituída pelo ácido quínico esterificado ao ácido cafeico. Também são encontrados na forma de glicosídeos ou ligados a proteínas e a outros polímeros da parede celular e, raramente, como ácidos livres. Isômeros do ácido clorogênico e do ácido cafeico são descritos como antioxidantes (BELITZ & GROSCH, 1988; DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004)

Os ácidos fenólicos, encontrados nas microalgas e nas plantas, podem apresentar várias atividades biológicas, dentre elas, antioxidante, antiinflamatória,

anticarcinogênica, antibacteriana e antifúngica (SOUZA et al., 2011). Além disso, estudos têm indicado um efeito inibitório dos compostos fenólicos no crescimento de fungos e produção de micotoxinas. Os ácidos fenólicos como o ferúlico, cinâmico e vanílico e seus derivados presentes em plantas são inibidores do crescimento fúngico e desenvolvimento dos esporos fúngicos. Os ácidos *p*-hidroxibenzoico, vanílico e protocatequínico são inibidores somente em concentrações relativamente altas. No entanto, o metil éster ácido *cis*-ferúlico e o metil éster ácido *cis*-3,4-dimetoxicinâmico, derivados do ácido cinâmico, são encontrados como inibidores em pequenas concentrações na faixa de 1nM a 10nM, evidenciando que a atividade inibitória depende não só da concentração, mas também da estrutura do composto. O composto metil éster ácido *cis*-3,4-dimetoxicinâmico parece afetar particularmente o estágio de germinação dos esporos fúngicos (GRIFFIN, 1994). Porém, cabe salientar que os estudos foram conduzidos com compostos provenientes de outras fontes que não microalgas.

3.6.1 Métodos de análise

A separação, identificação, quantificação e aplicação dos compostos fenólicos em alimentos, acarreta problemas metodológicos, por tratar-se de uma família constituída por substâncias na maioria das vezes, de grande polaridade, muito reativos e susceptíveis à ação de enzimas, além de sua diversidade (AGUIAR et al., 2007; KING & YOUNG; 1999; SOUZA et al., 2009). Cabe lembrar também que suas propriedades absorventes e redutoras são semelhantes a outros constituintes das matrizes alimentares.

A análise de compostos fenólicos como a de outros compostos traços é influenciada pela natureza do composto, o método de extração empregado, o tamanho da amostra, o tempo e as condições de estocagem, o padrão utilizado e a presença de interferentes tais como ceras, gorduras, terpenos e clorofilas. Ainda não se desenvolveu um método satisfatório para a extração de todos ou de uma classe específica de fenólicos presentes em matrizes diversas. A solubilidade deles varia com os substituintes das cadeias carbonadas cíclicas, o grau de polimerização e suas interações com outros constituintes dos tecidos onde se encontram. Os solventes mais utilizados para a extração são: metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila, propanol, dimetilformaldeído e suas combinações (NACZK & SHAHIDI, 2004).

Outro aspecto importante no desenvolvimento de métodos de quantificação de compostos fenólicos é a dificuldade de se encontrar um padrão específico e

conveniente, devido à complexidade das substâncias fenólicas presentes nas diferentes fontes destes e as reatividades distintas entre estas substâncias e os reagentes derivatizantes são outro fator de variabilidade (ANGELO & JORGE, 2007).

As metodologias utilizadas na quantificação destes compostos podem ser divididas em análises espectrofotométricas e análises cromatográficas. As análises espectrofotométricas baseiam-se em diversos princípios e podem ser empregadas para quantificação de vários grupos estruturais. De acordo com Naczk e Shahidi (2004), a análise que emprega o reagente de Folin-Denis foi uma das primeiras a ser utilizada (SINGLETON & ROSSI, 1965) e foi sofrendo modificações ao longo do tempo, utilizando-se, atualmente, o reagente de Folin-Ciocalteu.

A quantificação dos compostos fenólicos totais pela metodologia que emprega o reagente de Folin-Ciocalteu baseia-se na redução dos ácidos fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), presentes no reagente de Folin-Ciocalteu, pelos fenólicos presentes na amostra a óxido de tungstênio (W_8O_{23}) e óxido de molibdênio (Mo_8O_{23}) em meio alcalino (Equação 1). Estes óxidos formados apresentam coloração azulada, sendo possível a quantificação da absorvância da solução na região do visível (750 nm). Através de uma curva de calibração de ácido gálico é possível correlacionar a intensidade da cor à concentração de fenóis presentes na amostra, sendo o resultado expresso em equivalente de ácido gálico (GAE).



Na identificação e quantificação de compostos fenólicos, principalmente ácidos fenólicos, são empregadas técnicas como eletroforese capilar com detecção eletroquímica, e detecção fotométrica no ultra-violeta, cromatografia a gás (CG) com espectrômetro de massas, cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção UV (CLAE-UV) e cromatografia líquida de alta eficiência com detectores MS e UV-Vis, onde CG e CLAE são as técnicas mais utilizadas. A vantagem da análise destes compostos por CLAE em relação a CG é que na primeira não há necessidade de derivação química dos analitos.

Na CLAE, as colunas de fase reversa são as mais comumente utilizadas, principalmente C18, variando de 150 a 250 mm de comprimento, com diâmetro interno variando de 4,6 mm e tamanhos de partículas de 5 μ m. A eluição das fases móveis são normalmente binárias, com uma solução acidificada (solvente A) como o ácido acético aquoso, ácido perclórico, ou ácido fórmico e um solvente

orgânico, como metanol ou acetonitrila (solvente B). Compostos fenólicos simples apresentam uma única banda de absorção na faixa de 240 nm a 290 nm (BERNAL et al., 2011).

As separações cromatográficas em gel, papel e camada delgada, têm sido bastante utilizadas, porém, atualmente, a CLAE é a técnica mais utilizada para a identificação e quantificação de compostos fenólicos bem como para avaliação das interações destes com outros componentes da matriz (NAZCK & SHAHIDI, 2004). Estas técnicas têm sido modificadas quer seja na etapa de preparo da amostra ou extração dos compostos, tanto na fase móvel e ou estacionária, para uma melhor separação dos compostos.

3.7 Agentes antifúngicos

As primeiras descrições sobre o uso de antimicrobianos datam de 3.000 anos atrás, quando os médicos chineses usavam fungos para o tratamento de feridas infeccionadas. Assim o faziam também os índios norte-americanos, e os médicos indianos, que recomendavam a ingestão de certos fungos para a cura de diarreias. Embora utilizados de maneira empírica na época, vários destes produtos indicados na antiguidade e na Idade Média apresentam propriedades terapêuticas anti-infecciosas graças a compostos sintetizados pelos micro-organismos.

Rotineiramente, a indústria de alimentos vêm empregando agentes antimicrobianos para aumentar a vida útil e preservar produtos processados, de forma controlada por normas legais em diferentes países (DAVIDSON & PARISH, 1989; PRAKASH et al., 2011).

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

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

Segundo Belitz & Grosch (1988), desde muito tempo tem-se conservado os alimentos com ácidos, especialmente o ácido acético (CH_3COOH) sob a forma de vinagre e seus sais, como o acetato de sódio (CH_3COONa), acetato de potássio

(CH_3COOK), acetato de cálcio [$(\text{CH}_3\text{-COO})_2\text{Ca}$] e o diacetato de sódio ($\text{CH}_3\text{-COONa}$. $\text{CH}_3\text{-COOH}$. $1/2\text{H}_2\text{O}$). Estes sais são usados em panificação para inibir o crescimento fúngico sem afetar as leveduras fermentadoras. A atividade antimicrobiana do ácido acético, igual aos demais ácidos graxos alifáticos, aumenta ao diminuir o pH.

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

Os extratos de alguns condimentos, ervas de importância medicinal e outros vegetais também possuem propriedades antifúngicas, agentes antifúngicos naturais que vêm sendo explorados por seu potencial no controle do crescimento de fungos e consequente inibição da produção de micotoxinas (SELVI et al., 2003).

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

Cada vez mais ao longo dos anos, tem havido grande interesse no uso de produtos naturais como agentes fungicidas também para controlar patógenos de plantas. Comercialmente, estão disponíveis fungicidas sintéticos que têm se mostrado prejudiciais ao meio ambiente, aos seres humanos e animais. Por causa do uso prolongado ou excessivo de alguns fungicidas, alguns micro-organismos tornam-se resistentes e em consequência ineficazes (BELEWA et al., 2011; SOUZA et al., 2011, TIAN et al., 2012).

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. Existe também a perspectiva de substituir os aditivos sintéticos por conservantes naturais presentes nos vegetais (PUUPPONEN-PIMIA et al., 2001; SELVI et al., 2003)

Para minimizar os riscos para a segurança alimentar, através do retardamento das ações microbianas e considerando a toxicidade ou suspeita de toxicidade de alguns aditivos químicos e o abuso de utilização deles, os órgãos legislativos e de saúde pública tem recomendado uma diminuição nos índices de utilização de aditivos químicos na indústria de alimentos. A investigação da potencialidade antimicrobiana de produtos naturais com propriedades antifúngicas também é impulsionada pelo progressivo surgimento de cepas microbianas resistentes decorrentes do abuso ao longo de anos de utilização de compostos antimicrobianos (BRULL & COOTE, 1999; MELO & GUERRA, 2002; KUMAR et al., 2010).

Vários estudos têm comprovado que o efeito de compostos isolados extraídos de matrizes vegetais e microbianas atuam como fungicidas naturais inibindo a atividade fúngica e, um número significativo destes constituintes tem se mostrado eficaz. Em estudos de cunho científico as especiarias e seus produtos derivados (extratos, óleos essenciais e outros) tem sempre mostrado resultados satisfatórios na inibição de micro-organismos patógenos(oportunista e primários) deteriorantes, e/ou na inibição da produção de toxinas microbianas (ARORA & KAUR, 1999; AL-JEDAH et al., 2000; CHAO & YOUNG, 2000; JUGLAL et al., 2002; KIZIL & SOGUT, 2003; PEREIRA et al., 2006; KUMAR et al., 2010; SOUZA et al., 2010; 2011, TIAN et al., 2012).

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

Quiroga et al. (2001) verificaram a atividade antifúngica de metabólitos secundários extraídos de 10 espécies de plantas medicinais da Argentina e

observaram, através de crescimento radial dos fungos, discos de difusão e crescimento em ágar contendo os extratos das plantas, que alguns extratos alcoólicos estudados inibiram o desenvolvimento de fungos e leveduras. A concentração mínima de extratos necessária contra leveduras variou de 100 a 400 $\mu\text{g}_{\text{extrato seco/mL de ágar}}$.

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

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

Souza et al. (2010) estudaram a atividade antifúngica de compostos fenólicos extraídos de cebola, farelo de arroz e da microalga comercial *Chlorella pyrenoidosa*, pelo método de ágar diluído contra o fungo *Rhizopus oryzae*, e concluíram que os extratos fenólicos da cebola extraídos com metanol e acetato de etila, e o extrato de farelo de arroz apresentaram atividade antifúngica, atingindo no 5º dia 38, 30 e 17% de inibição para o extrato metanólico de cebola, acetatoetílico de cebola e metanólico de farelo de arroz, respectivamente. Os extratos aquosos de cebola e metanólico de *Chlorella pyrenoidosa* nas concentrações testadas (3,0 a 3,7 $\mu\text{g}_{\text{fenóis/mL}_{\text{meio}}}$) não apresentaram atividade antifúngica contra o fungo testado.

Tantawy (2011) estudou o potencial de inibição das cianobactérias *Nostoc muscorum*, *Spirulina platensis* e *Anabaena flos-aquae* contra os fungos *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani*. Os resultados revelaram alta eficiência dos extratos das algas em inibir o crescimento do diâmetro micelial de fungos. Os melhores resultados foram obtidos por *Spirulina platensis*, apresentando até 51% de inibição do diâmetro do halo.

3.8 Mecanismo de ação dos compostos inibidores do crescimento fúngico

A célula microbiana é uma estrutura altamente organizada, contendo sistemas sintéticos controlados e integrados para se reproduzir. Porém, quando são danificados, ocorre desorganização e morte do organismo. Este dano pode surgir da interferência sobre a síntese ou função de uma proteína simples, ácido nucleico, ou particular complexo lipoproteico.

As plantas podem produzir compostos antifúngicos para se proteger de ataques por fungos resistentes. O entendimento do mecanismo inibitório pode subsidiar ao desenvolvimento de tecnologia de produção e aplicação eficiente destes antifúngicos naturais produzidos por vegetais ou espécies microbianas (QUIROGA et al., 2001).

Os compostos antifúngicos de ocorrência natural exercem diferentes mecanismos de defesa nos vegetais. Os compostos fenólicos, proteínas, óleos essenciais e outros compostos podem atuar na inibição da biossíntese de componentes da parede celular como 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 estar em quantidades excedentes produzindo resíduos tóxicos, em vista de que a adição nem sempre gera uma atuação específica e eficiente.

3.9 Atividade antioxidante

Uma substância antioxidante pode ser definida como um composto ou substância química que inibe a oxidação, quando presente em baixa concentração comparada a do substrato oxidável, diminui ou inibe significativamente a oxidação do mesmo. Do ponto de vista biológico, pode se definir antioxidantes como compostos que protegem sistemas biológicos contra os efeitos potencialmente danosos de processos ou reações que promovem a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares (ROGINSKY & LISSI, 2005).

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).

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 têm sido associados a danos de várias ordens incluindo o seu potencial carcinogênico, aumento do peso do fígado e significativa proliferação do retículo endoplasmático (MELO & GUERRA, 2002; YILDRIM et al., 2002; DEGÁSPARI & WASZCZYNSKY, 2004). 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).

Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas; um dos mais usados consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2- difenil-1-picril-hidrazila - DPPH•, de coloração púrpura que absorve radiação a 515 nm (ROGINSKY e LISSI, 2005). Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R•), o DPPH• é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorvância. 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).

Os radicais livres de DPPH, que inicialmente apresentam cor roxa por possuírem elétron livre, perdem esta cor quando um radical hidrogênio doado por uma molécula antioxidante entra em ressonância com a molécula de DPPH, diminuindo a absorvância. O DPPH é um radical estável, com baixa taxa de deterioração e possui reatividade com a maioria dos compostos. Apenas reagentes redutores fortes são capazes de reagir com estes radicais estáveis estequiometricamente. A baixa absorvância indica atividade sequestrante de radicais livres (SANTOS et al., 2007).

A atividade antioxidante também pode se manifestar na inibição dos efeitos de oxidorreduções 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.

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).

Os lipídios podem ser oxidados por diferentes caminhos e usualmente o início são as reações hidrolíticas catalisadas pelas enzimas lípases ou pela ação de calor e umidade, com formação de ácidos graxos livres. A autooxidação é o principal mecanismo de oxidação dos óleos e gorduras e está associada à reação do oxigênio com ácidos graxos insaturados ocorrendo em três etapas, conforme Ramalho & Jorge (2006).

- Iniciação: etapa onde ocorre a formação dos radicais livres devido à retirada de um hidrogênio do carbono alílico na molécula do ácido graxo, em condições favorecidas por luz e calor.

- Propagação: Os radicais livres são susceptíveis ao ataque do oxigênio atmosférico, sendo convertidos em outros radicais, gerando produtos primários de oxidação (peróxidos e hidroperóxidos) cuja estrutura depende da natureza dos ácidos graxos presentes. Os radicais livres formados atuam como propagadores da reação, resultando em um processo autocatalítico.

- Terminação: etapa onde dois radicais se combinam, com a formação de produtos estáveis (produtos secundários de oxidação) obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (epóxidos, compostos voláteis e não voláteis).

Dentre os ensaios que utilizam lipídios como substratos destaca-se o do tiocianato férrico, índice de peróxido e dienos conjugados. O método tiocianato férrico é utilizado para medir a quantidade de peróxido gerado durante a oxidação de uma solução de ácido linoleico incubada sob aquecimento (50 °C). Os peróxidos formados reagem com Fe^{2+} dando origem ao Fe^{3+} que complexa com íons tiocianato (SCN^-),

tornando a solução avermelhada. A intensidade da cor vermelha é monitorada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 500 nm (LIU & YAO, 2007).

O índice de peróxido (IP) é o método mais comum para determinar o estado oxidativo de sistemas lipídicos. A quantificação dos peróxidos gerados tem como base duas de suas propriedades: a) liberar iodo da solução de iodeto de potássio, b) oxidar íons Fe^{2+} a Fe^{3+} . O IP é geralmente expresso em termos de miliequivalentes de peróxidos por quilograma do óleo (OLIVEIRA et al., 2009). As principais fontes de erro do método iodométrico são a absorção de I_2 pelas duplas ligações e a liberação de I_2 do iodeto de potássio (KI) pelo O_2 atmosférico (ANTOLOVICH et al., 2002).

3.10 Microalgas

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

As microalgas estão entre os sistemas biológicos mais eficientes para transformação de energia solar em compostos orgânicos, através da fotossíntese (VONSHAK, 1997). Acredita-se que tenham surgido a mais de 3 milhões de anos e formaram a atual atmosfera, e desde então regulam a biosfera do planeta retirando CO_2 e produzindo O_2 (ROMANO et al., 2000). Podem ser cultivadas em ambientes inaptos, tais como lagos salinos adjacentes a desertos. Elas possuem um enorme potencial de aproveitamento, como por exemplo, fonte de diversos compostos químicos de interesse (HENRIKSON, 1994).

As microalgas representam os micro-organismos fotossintéticos procarióticos (cianobactérias) antigamente chamadas de algas azul-esverdeadas, e eucarióticos (algas verdadeiras). São geralmente unicelulares, gram-negativas, coloridas devido a presença dos pigmentos fotossintéticos, e vivem, em sua maioria, em ambientes aquáticos (OLAIZOLA, 2003; TOMASELLI, 1997). Sua importância na natureza refere-se principalmente a elevada participação no balanço global da fotossíntese, contribuindo com grande parcela da produção primária do planeta. No mar, cerca de 90% da fotossíntese é realizada pelas diversas microalgas que constituem o fitoplâncton (LOURENCO, 2006).

As culturas comerciais de microalgas em grande escala iniciaram por volta de 1960 no Japão, com a *Chlorella*, seguida pela cultura de *Spirulina* em 1970 no México, ambas para emprego como suplemento alimentar; *Dunaliella salina* para produção de

β -caroteno na Austrália em 1986, *Haematococcus pluvialis* para produção de caroteno e várias outras espécies para a aquicultura. Após, o cultivo de microalgas se espalhou pelo mundo, em países como Israel, EUA e Índia. Nos anos 80, cerca de 46 fábricas na Ásia produziam mais de 1000 kg de microalgas por mês e em 1996 cerca de 2000 toneladas de *Chlorella* foram produzidas comercialmente somente no Japão (BOROWITZKA, 1999).

Muitos estudos vêm sendo realizados com relação às aplicações relacionadas ao emprego das microalgas e dos produtos extraídos destas na indústria de alimentos tais como: no tratamento de águas residuais de inúmeros processos industriais, para a detoxificação biológica e remoção de metais pesados, como bioindicadores, na detecção de nutrientes e substâncias tóxicas e também como suplemento alimentar. As microalgas podem produzir uma gama de moléculas bioativas com propriedades antibióticas, anticâncer, anti-inflamatórias, antivirais, redutoras do colesterol, enzimáticas e com outras propriedades farmacêuticas. O conteúdo lipídico confere potencial para seu emprego na produção de biocombustíveis (biodiesel, por exemplo) (DERNER et al., 2006). Muitas espécies de microalgas e cianobactérias podem ser estimuladas a acumular diferentes tipos de reservas que podem ser usadas como pigmentos, fonte de lipídios, vitaminas e/ou proteínas (OLVERA-RAMIREZ et al., 2000).

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

Os cultivos de microalgas, em comparação aos cultivos vegetais, além de utilizar menores áreas, independem da qualidade do solo, podendo ser desenvolvidos em solos estéreis, inutilizáveis para a agricultura e até mesmo no deserto; ou em solos férteis, sem causar impacto. Microalgas necessitam 3 vezes menos água que a soja e utilizam apenas 2% da água necessária para o gado, podendo esta ser, para a maioria destes micro-organismos fotossintéticos, salina, alcalina, ou até mesmo residual, impróprias para a agricultura. Para produzir a mesma quantidade de proteínas as microalgas necessitam 20 vezes menos área que a soja e 200 vezes menos área que o gado (HENRIKSON, 1994).

3.10.1 *Chlorella*

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

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

A microalga *Chlorella* é a alga unicelular mais completa em termos de aminoácidos, contém mais de 20 tipos de vitaminas e minerais, com destaque para β -caroteno (precursor da vitamina A) e vitamina B₁₂, difícil de ser obtida por meio de outros alimentos. Promove a desintoxicação orgânica, inclusive de metais pesados como o chumbo e cádmio. Elimina toxinas retidas nos tecidos orgânicos, provenientes de alimentação industrializada, tem ação protetora contra agentes tóxicos, poluentes e contra diversos tipos de radiação, principalmente atômica e solar (raios ultravioletas). Sua alta concentração em clorofila indica que possui capacidade desintoxicante, e auxiliar no sistema digestivo. Pode ainda auxiliar no controle da obesidade, promovendo uma sensação de saciedade quando ingerida antes das refeições, além de fornecer elementos normalmente ausentes nos regimes de emagrecimento.

A microalga *Chlorella* possui certificado GRAS (Generally Recognized As Safe) emitido pelo FDA (Food and Drug Administration), podendo ser utilizada como alimento sem oferecer risco à saúde humana. Também tem demonstrado excelentes resultados no combate à hipertensão, na redução dos níveis de colesterol e pelo bom funcionamento do organismo. No entanto, há poucos estudos na literatura sobre sua atividade antimicrobiana e antifúngica (SOUZA et al., 2010).

Espécies do gênero *Chlorella* são estudadas há mais tempo quanto a produção em massa para alimentação humana, sendo atualmente produzidas por mais de 70 empresas no mundo todo, sendo que a maior produtora mundial gera 400 t de biomassa seca ao ano. Esta produção é inteiramente dedicada ao consumo humano, sendo comercializada nas formas de pílulas, pó (para misturas em alimentos), sucos, extratos concentrados líquidos e barras gelatinosas. A produção mundial anual de *Chlorella* atinge mais de 2.000 t ao ano. Foi a primeira microalga comercializada como pílulas formadas por alga em pó prensada para consumo humano, tendo ocorrido no Japão, em 1964 (LOURENÇO, 2006).

3.10.2 *Spirulina platensis*

A *Spirulina* pertence ao gênero bacteriano *Cyanobacterium* o qual era anteriormente classificado como *Cyanophyta* ou grupo das algas verde-azuladas. Descende dos primeiros seres fotossintetizantes e apresenta os maiores índices de produção de biomassa dentre as espécies do planeta. Quando comparadas aos vegetais superiores e aos animais, como fonte de produtos e nutrientes imprescindíveis para a qualidade de vida do homem, estes levam grande vantagem devido à rapidez com que se reproduzem e facilidade de cultivo em zonas não apropriadas para a agricultura (AMBROSI et al., 2008).

A *Spirulina* é uma cianobactéria filamentosa, formada por células dispostas ao longo de um filamento em espiral com até 1,0 mm de comprimento. Assim como as plantas verdes superiores, seu metabolismo principal é a fotossíntese, e a fonte principal de energia é a luz solar. O componente em maior concentração na biomassa da *Spirulina* é a proteína, que apresenta quantidades variando de 64 a 74%. Lipídeos e carboidratos variam entre 6 a 13% e 12 a 20%, respectivamente (VONSHAK, 1997). É considerada uma excelente fonte de pró-vitamina A (β -caroteno) além de ferro biodisponível e outros minerais, compostos fenólicos, ficocianina, ácido gama linoléico e ácido linolênico (VON DER WEID et al., 2000; BELAY et al., 2002).

Os estudos científicos não documentam nenhuma toxicidade da microalga *Spirulina*, daí seu uso seguro e nutritivo. Entretanto esta toxicidade pode ocorrer através da contaminação do cultivo com o contato da cultura de *Spirulina* com outras microalgas tóxicas (HENRIKSON, 1994; MULITERNO et al., 2005).

Em função de sua composição a *Spirulina platensis* apresenta propriedades antioxidantes e antimutagênicas, devido a presença de compostos fenólicos, favorecendo o seu uso como alimento funcional (ABEDIN & TAHA, 2008; SOUZA et

al., 2011; TANTAWY, 2011), fato que tem motivado a sua comercialização em vários países para formulação de alimentos diversos e com finalidades terapêuticas. No entanto, há poucas evidências na literatura sobre sua atividade antifúngica

A ingestão de *Spirulina* tem mostrado efeito preventivo contra estresse oxidativo induzido. Além disso, tem sido demonstrado seus efeitos protetores contra o estresse oxidativo induzido pelo acetato de chumbo no fígado e rins de ratos. A alimentação a base de *Spirulina platensis* também reduz a hepatotoxicidade induzida pelo cádmio em ratos e o efeito é sugerido para ser mediada através de suas propriedades antioxidantes. A *Spirulina* também é conhecida por ter efeitos protetores contra a nefrotoxicidade devido ao dano oxidativo induzido por gentamicina (KARADENIZ et al., 2009).

Os compostos fenólicos existentes na *Spirulina* spp. são ácidos orgânicos como os ácidos cafêico, clorogênico, salicílico, sináptico e *trans*-cinâmico, os quais agem individualmente ou sinergicamente como compostos antifúngicos e antioxidantes em sistemas *in vivo* e *in vitro* (MIRANDA et al., 1998; ESTRADA et al., 2001; SOUZA et al., 2011). A implementação na concentração de compostos fenólicos foi relatada por Colla et al. (2007) quando a biomassa foi produzida a 35 °C com concentrações de nitrato de sódio no meio de cultivo de 1,875 a 2,5 g/L.

O constante interesse em estudar os fatores físico-químicos e nutricionais limitantes do seu crescimento, bem como a aplicação de condições de estresse no meio de cultivo justificam-se pelos resultados econômicos que resultam em maior rendimento de biomassa e produção de compostos de interesse específicos. Os constituintes necessários para o crescimento celular são: água, fonte de carbono, nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio.

O meio padrão para cultivo de *Spirulina* foi desenvolvido por Zarrouk (1996) e fornece entre outros nutrientes, carbono inorgânico na forma de CO_3^{-2} e HCO_3^- que se convertem em CO_2 utilizado na fotossíntese. A fonte de carbono constitui um dos maiores componentes de custo para produção de *Spirulina* e estudos concluíram estar o meio Zarrouk concentrado em nutrientes, de modo que se abre uma possibilidade de redução de custos de produção de cianobactérias. A *Spirulina*, ao contrário de outras cianobactérias, apresenta baixa susceptibilidade a contaminação de seus cultivos por outros micro-organismos devido ao alto pH, em que se desenvolve, de modo que os fotobiorreatores (FBRs) para o cultivo podem ser abertos, sendo geralmente na forma

retangular com cantos arredondados. A temperatura ótima de crescimento oscila em torno de 35 °C (VONSHAK, 1997).

A Figura 1 mostra os fotobiorreatores construídos para a produção de *Spirulina platensis* pelo laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande com água da Lagoa Mangueira.



Figura 1: Fotobiorreatores onde é realizado o cultivo de *Spirulina platensis* na planta de Santa Vitória do Palmar (Rio Grande do Sul).

O cultivo comercial de *Spirulina* é realizado com diversas finalidades, onde esta cianobactéria utilizada como alimento, suplemento alimentar ou dietético, ração animal em piscicultura, produtos farmacêuticos, alimento nutracêutico e no tratamento de efluentes industriais.

CAPÍTULO III

4. DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Para melhor entendimento, o trabalho foi dividido em cinco artigos:

Artigo 1: Determinação de ergosterol e glicosamina para estimativa de biomassa *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus flavus*

Artigo 2: Inibição da biomassa de *Rhizopus oryzae* na presença de extratos fenólicos de *Spirulina platensis* e *Chlorella* sp.

Artigo 3: Avaliação da atividade antifúngica de extrato fenólico de *Spirulina platensis* contra *Aspergillus flavus*

Artigo 4: Atividade antioxidante *in vitro* de extratos fenólicos das microalgas *Spirulina platensis* e *Chlorella* sp.

Artigo 5: Atividade antiaflatoxina de compostos fenólicos naturais da *Spirulina platensis*.

O artigo 3 foi publicado na revista Ciência e Agrotecnologia conforme Anexo 1.

ARTIGO 1

**Determinação de ergosterol e glicosamina para estimativa de biomassa de
Rhizopus oryzae e *Aspergillus flavus***

Michele Moraes de Souza, Eliana Badiale-Furlong

RESUMO

Métodos acurados e confiáveis para a medida da biomassa fúngica são essenciais na quantificação do crescimento fúngico, sendo os mais promissores os que determinam componentes químicos específicos das células fúngicas, tais como a glicosamina (quitina) e o ergosterol. O objetivo deste estudo foi estabelecer correlações entre o desenvolvimento fúngico e componentes celulares de forma a quantificar a biomassa em diferentes estágios de desenvolvimento. O crescimento micelial do *Rhizopus oryzae* CCT 7560 e do *Aspergillus flavus* CCT 1217 foi avaliado pela determinação da biomassa seca, de ergosterol e de glicosamina. A correlação obtida foi de 0,9912 entre a biomassa e o conteúdo de glicosamina e de 0,9797 entre a biomassa e o conteúdo de ergosterol para o *Rhizopus oryzae*, para o *Aspergillus flavus* foi de 0,9688 entre a biomassa e o conteúdo de glicosamina e de 0,9859 entre a biomassa e o conteúdo de ergosterol, entre a produção de ergosterol e glicosamina foi de 0,9962 para o *Aspergillus flavus* e de 0,9926 para o *Rhizopus oryzae*, mostrando que a determinação em conjunto destes dois componentes permite uma quantificação confiável da biomassa fúngica.

Palavras-chave: biomassa, crescimento fúngico, célula fúngica, ergosterol, glicosamina.

ABSTRACT

Methods for accurate and reliable measure of the fungal biomass is essential in the quantification of fungal growth, and the most promising determining the specific chemical components of fungal cells, such as glucosamine (chitin) and ergosterol. The objective of this study was to establish correlations between fungal growth and cellular components in order to quantify the biomass at different stages of development. The mycelial growth of *Rhizopus oryzae* CCT 7560 and CCT 1217 *Aspergillus flavus* was evaluated by determination of dry biomass, ergosterol and glucosamine. The correlation was found between the biomass and 0.9912 glucosamine content between 0.9797 and biomass and ergosterol content to *Rhizopus oryzae*, to *Aspergillus flavus* 0.9688 was between biomass and the content of glucosamine and 0.9859 between biomass and ergosterol content, between the production of ergosterol and glucosamine was 0.9962 to 0.9926 and *Aspergillus flavus* to *Rhizopus oryzae*, showing that the determination of these two components together allows for reliable quantification fungal biomass.

Keywords: biomass, ergosterol, fungal growth, fungal cell, glucosamine.

1. INTRODUÇÃO

Os fungos, devido a sua grande versatilidade, podem crescer em substratos de composição variada, onde, outros micro-organismos não mostrariam multiplicação (PUTZKE & PUTZKE, 2002; TANAWAKI & SILVA, 1996). Estes micro-organismos são ubíquos em decorrência de possuírem fases esporuladas, que possibilita a disseminação no solo, água, no ar e em tecidos vegetais. Embora os micro-organismos possam ser inativados ou retirados durante o processamento e estar ausentes em produtos manufaturados, se houver a produção de toxinas por espécies toxigênicas, estas permanecem estáveis (MOSS, 1992).

Os fungos são organismos microbianos que se desenvolvem num sistema de associação através de hifas, o que lhes confere a condição de modelos de sucesso de adaptação a diferentes condições do meio ambiente (GUTAROWSKA & ZAKOWSKA, 2009). No entanto, métodos e técnicas para manusear e mensurar biomassa fúngica são um desafio. Assim, desenvolver metodologias confiáveis para avaliar sua multiplicação é indispensável para estudar seu papel no processamento de matérias orgânicas e na dinâmica trófica dos diferentes ecossistemas (GESSNER & SCHWOERBEL, 1991, GESSNER & CHAUVET, 1997).

Os métodos indiretos de determinação da biomassa monitoram componentes específicos do metabolismo fúngico, de forma relativamente simples, mas podem apresentar limitações, pelo fato dos teores dos diferentes componentes celulares sofrerem modificações significativas ao longo do ciclo biológico destes micro-organismos (OOIJKAAS et al., 1998). A glicosamina, o ergosterol, as proteínas e os ácidos nucléicos, ou medidas da atividade biológica, como por exemplo a respiração, são muito empregadas para esta avaliação, pela rapidez, resposta e menor número de experimentos de cultivo necessários.

A vantagem da determinação da glicosamina como um indicador de crescimento, é o fato de estar restrita ao reino fungi tornando a medida especialmente útil quando o fungo se desenvolve em materiais vegetais (SPARRINGA & OWENS, 1999). Ela é a unidade monomérica da quitina, polímero constituinte da parede celular dos fungos. Sua determinação quantitativa envolve a despolimerização da molécula de quitina seguida da quantificação da glicosamina liberada. Os níveis produzidos podem variar com a composição do meio, condições de cultivo e espécie fúngica (DESGRANGES et al., 1991; TOMASELLI-SCOTTI et al., 2001).

O ergosterol é um lipídio da classe dos esteróis, constituinte da membrana plasmática dos fungos. Este composto é um bom indicador de crescimento fúngico, pois pode proporcionar uma boa correlação com a biomassa metabolicamente ativa do fungo, permitindo monitorar as alterações durante a multiplicação fúngica (TIAN et al., 2012). Os principais métodos de extração envolvem três estágios: extração da amostra, separação do extrato e quantificação, como ele tem em sua estrutura capacidade de interagir com a radiação eletromagnética na região do ultravioleta (283 nm), permite que ele seja identificado e quantitativamente estimado, tanto por espectrofotometria (MARTIN et al., 1990, TIAN et al., 2012), quanto por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (GALVÃO et al., 2003).

Na produção de biomassa os gêneros de maior destaque são: *Rhizopus*, *Aspergillus* e *Mucor* (ANUPAMA & RAVINDRA, 2000). As espécies do gênero *Aspergillus* são economicamente importantes, pois são utilizadas em numerosas fermentações, incluindo a produção de ácidos cítrico e glutâmico e para enriquecimento proteico de matérias lignocelulósicas (GREWAL & KALRA, 1995; HAQ et al., 2003). Para a produção de enzimas, *Aspergillus oryzae* vem sendo utilizado principalmente para a produção de α – amilase, mas também de outras enzimas, como poligalacturonase e polimetilgalacturonase (NEMEC et al., 1997). Algumas espécies também se destacam por contaminar os alimentos produzindo micotoxinas, como é caso do *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.

As espécies de *Rhizopus* apresentam rápido crescimento em diversos ambientes, como solos e vegetais, especialmente naqueles contendo açúcares solúveis e amido, o que justifica sua associação ao apodrecimento de frutas. São interessantes para a fermentação em estado sólido na produção de enzimas como fitases, lipases e glicoamilases, além disso são usados para a produção de queijos e ácidos orgânicos.

O objetivo do trabalho foi estabelecer correlações entre o desenvolvimento fúngico e componentes celulares de forma a possibilitar a quantificação da biomassa de *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus flavus* através da determinação de ergosterol e glicosamina em diferentes intervalos de crescimento, visando disponibilizar procedimento confiável para avaliar a multiplicação da biomassa nos diferentes estágios do ciclo de desenvolvimento fúngico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados neste trabalho foram os fungos filamentosos *Rhizopus oryzae* CCT 7560 e *Aspergillus flavus* CCT 1217 depositados na coleção de culturas da Fundação Tropical de Pesquisa André Tosello, Campinas – SP, Brasil. As culturas foram mantidas em Ágar Batata Dextrose (BDA) a 30 °C durante 7 dias para o primeiro e a 24 °C durante 12 dias para o segundo, até a completa esporulação.

As suspensões de esporos utilizadas foram obtidas após a propagação em meio BDA, seguida de recuperação dos esporos do meio com solução 0,2% Tween 80, filtração e enumeração de esporos em câmara de Neubauer, padronizando a solução de trabalho para 4×10^7 esporos/mL.

2.2 Determinação da temperatura ótima de crescimento através da medida do crescimento radial de *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus flavus*

As placas de Petri contendo meio BDA 4% foram inoculadas no centro com a suspensão de esporos, sendo a leitura do crescimento do halo realizada em 3 direções. As placas foram incubadas em condições isotérmicas nas temperaturas de 20 °C, 25 °C, 30 °C, 34 °C e 40 °C para o *Rhizopus oryzae* e 20 °C, 22 °C, 24 °C e 28 °C e 33 °C para o *Aspergillus flavus*.

A medida do crescimento radial foi realizada diariamente até que o micélio alcançasse a extremidade da placa ou por um período não superior a 96 horas para o *Rhizopus oryzae* e 168 horas para o *Aspergillus flavus*.

2.3 Determinação da biomassa seca do micélio

As placas de Petri contendo o meio BDA (4%) foram inoculadas com a solução de esporos de *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus flavus* no centro, sendo no 2°, 4°, 8°, 10° e 12° dias de incubação retiradas 3 placas e congeladas a -18 °C. O micélio foi separado do meio de cultura e a massa seca foi determinada em estufa a 70 °C até peso constante. O experimento foi realizado em triplicata.

2.4 Determinação de ergosterol

A solução padrão continha 0,3 mg de ergosterol/mL de metanol (Sigma, Estados Unidos, pureza mínima de 90%) que foi diluída para obter as concentrações entre 1,5 e 16,5 µg de ergosterol/mL de metanol. As absorvâncias das soluções foram

medidas a 283 nm em espectrofotômetro de feixe duplo Varian 100, obtendo-se uma curva de calibração para estimativa do analito.

Foi empregado o método de Gutarowska & Zakowska (2009) adaptado para determinar o conteúdo de ergosterol na biomassa seca e homogeneizada. O procedimento consistiu em homogeneizar 0,2 g de biomassa fúngica com 10 mL de metanol sob agitação orbital a 200 rpm por 30 minutos. A fração metanólica foi separada, e ao resíduo da biomassa fúngica foram adicionados mais 10 mL de metanol seguindo-se mais 20 minutos de agitação. Os sobrenadantes metanólicos foram homogeneizados e centrifugados a 3000 g a 20 °C por 10 minutos. Ao sobrenadante da mistura centrifugada foram adicionados 20 mL de KOH/metanol, aquecido sob refluxo por 30 min e resfriado a 4 °C. A mistura refluxada foi submetida a quatro partições com 20 mL de hexano cada uma. As frações hexânicas foram homogeneizadas e evaporadas em rotaevaporador a 60 °C e 40 rpm . O resíduo foi dissolvido com 10 mL de metanol e a absorvância determinada a 283 nm em espectrofotômetro. O conteúdo de ergosterol foi estimado a partir de uma curva de calibração de ergosterol e expresso em mg/g de biomassa seca. Também foi avaliada a recuperação do método com fortificação dos cultivos com ergosterol em níveis que variaram de 0,5 a 2,0 mg de ergosterol por grama de micélio seco, sendo estes níveis escolhidos conforme o limite de detecção do método.

2.5 Determinação de glicosamina

A solução padrão de glicosamina (Sigma, pureza mínima de 95%) continha 0,1 mg de glicosamina/mL de água, que foi diluída para obter as concentrações entre 3,0 e 20,0 µg de glicosamina/mL. As absorvâncias das soluções foram medidas a 530 nm em espectrofotômetro, e a absorvidade da glicosamina dada pela declividade da curva padrão.

A 0,2 g de biomassa seca, foram adicionados 5 mL de HCl 6M seguido de autoclavagem a 121 °C e 1,1 atm, durante 8 minutos. A mistura foi resfriada e filtrada para balão volumétrico de 5 mL e o volume completado com água destilada, sendo 1 mL transferido para balão volumétrico de 25 mL e neutralizado com solução de NaOH 3M, tendo fenolftaleína 0,5% como indicador. Foi realizada a titulação reversa com KHSO₄ 1% (m/v), até o desaparecimento da coloração rosa, seguido por elevação do volume do balão com água destilada.

Após a extração, 1 mL da solução foi transferida para tubos de ensaio, aos quais foram adicionados 1 mL da solução de acetil-cetona em 50 mL de Na₂CO₃ 0,5N,

seguido por aquecimento em banho de água fervente por 20 minutos. As amostras foram resfriadas e adicionados 6 mL de etanol e 1 mL de reagente de Erlich (2,67 g DAB - p_dimetilaminobenzaldeído - dissolvido em 15 mL de etanol e 15 mL de ácido clorídrico).

Os tubos reatores foram incubados a 65 °C em estufa durante 10 minutos. A absorvância foi lida em espectrofotômetro a 530 nm e o teor de glicosamina estimado através da absorvância da curva padrão. A recuperação do método foi determinada em níveis de fortificação que variaram de 1 a 3 mg de glicosamina/g micélio seco. Os níveis foram escolhidos conforme o limite de detecção do composto nas condições do método (AIDDO et al., 1981).

2.6 Análise estatística

Os resultados da biomassa seca de *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus flavus* foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação das médias, ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$), utilizando o programa Statística 7.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da multiplicação dos micro-organismos foi realizada em placas de Petri, pois esta técnica permite o desenvolvimento fisiológico de forma similar ao que ocorreria tendo material vegetal como substrato, porém sem a presença dos interferentes da matriz. Além de possibilitar estudos cinéticos de crescimento e conseqüentemente a modelagem matemática para o aumento de escala em fermentação em estado sólido (FES) ou avaliação de contaminação em condições naturais, muito necessária na indústria de alimentos para produção de insumos ou controle de contaminação.

Foram conduzidos experimentos para estabelecer a melhor temperatura de multiplicação dos fungos *Rhizopus oryzae* CCT 7560 e *Aspergillus flavus* CCT 1217, visando propiciar a avaliação dos indicativos de crescimento de biomassa na melhor condição específica para as cepas empregadas, tomando a velocidade de crescimento radial dos fungos para avaliar o efeito da variável.

Na Figura 1 está demonstrado o efeito da variação de temperatura no intervalo de 20 °C a 40 °C na velocidade de multiplicação radial do *Rhizopus oryzae* CCT 7560 e do *Aspergillus flavus* CCT 1217.

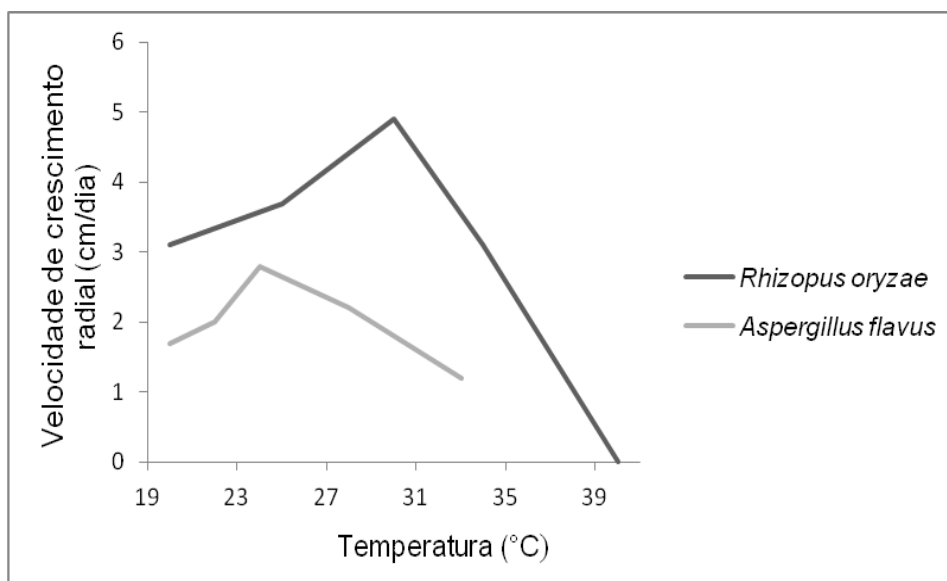


Figura 1: Variação da temperatura e a multiplicação radial de *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus flavus* em meio BDA.

A maior velocidade de crescimento radial do *Rhizopus oryzae*, 4,9 cm/dia, ocorreu a 30 °C. A 40 °C o crescimento da biomassa foi inibido significativamente, conforme esperado, visto que este é um processo exotérmico e o calor gerado deve ser dissipado, pois altas temperaturas não são favoráveis para o crescimento dos micro-organismos estudados. Ficou estabelecido que a temperatura ideal para o cultivo de *Rhizopus oryzae* no meio BDA foi 30 °C, também empregada em vários trabalhos com cepas desta espécie que vêm sendo cultivadas na faixa entre 30 °C e 37 °C (AIKAT & BHATTACHARYYA, 2000; NOPHARATANA et al., 2003). Também no caso do *Aspergillus flavus*, a temperatura influenciou a velocidade de crescimento radial, sendo que a 24 °C propiciou 2,8cm/dia de crescimento da biomassa, considerada a maior velocidade.

A maioria dos estudos considerando a influência da temperatura sobre a atividade microbiana avalia o efeito desta variável sobre a fase lag de crescimento, especialmente quando é necessário inibir a multiplicação microbiana, para prevenir danos à qualidade de diversos produtos. No caso do interesse em utilizar micro-organismo como agente transformador, a temperatura ótima de desenvolvimento é desejável, pois neste caso, por exemplo, o *Rhizopus oryzae* se desenvolveu cerca de duas vezes mais rápido que o *Aspergillus flavus*, o qual foi mais susceptível ao efeito de aumento da temperatura. Portanto, o estudo destes micro-organismos deve ser conduzido em temperaturas e intervalos distintos de tempo para acompanhar o ciclo de desenvolvimento de forma mais adequada.

Após determinada a temperatura ótima de crescimento dos fungos *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus flavus*, placas com solução de esporos foram incubadas e foi avaliada a biomassa seca no 2º, 4º, 8º, 10º e 12º dias para ambos. A Tabela 1 apresenta os níveis de biomassa seca resultante da multiplicação até o 12º dia de experimento e a significância de suas diferenças, nas respectivas temperaturas ótimas de desenvolvimento, de 30 °C para o *Rhizopus oryzae* e 24 °C para o *Aspergillus flavus*.

Tabela 1: Biomassa seca (gramas) de *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus flavus*.

	2º	4º	6º	8º	10º	12º
<i>Rhizopus oryzae</i>	0,11 ^{a,A}	0,17 ^{b,A}	0,26 ^{c,A}	0,32 ^{d,A}	0,36 ^{e,A}	0,38 ^{e,A}
<i>Aspergillus flavus</i>	0,08 ^{a,B}	0,24 ^{b,B}	0,39 ^{c,B}	0,48 ^{d,B}	0,56 ^{e,B}	0,59 ^{e,B}

Letras minúsculas iguais na linha não diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Letras maiúsculas iguais na coluna não diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

A biomassa seca foi determinada até o 12º dia de incubação, pois foi verificado que após este intervalo não havia diferença significativa em sua produção, por ambos os micro-organismos. Nesta fase o crescimento vegetativo pode ter cessado, seguindo-se o processo de diferenciação, com o desenvolvimento de hifas aéreas ou de estruturas de reprodução. Cabe salientar que apesar do *Rhizopus oryzae* ter apresentado maior velocidade de crescimento, apresentou menor biomassa em relação ao *Aspergillus flavus*, isto se deve às diferenças nas características que cada classe fúngica apresenta, sendo o primeiro do tipo zigomiceto e o segundo ascomiceto.

Os métodos analíticos para determinar ergosterol e glicosamina foram padronizados para atender os indicativos de eficiência adequados para a confiabilidade dos resultados, visando empregá-los para determinação quantitativa durante a multiplicação da biomassa fúngica. Na Tabela 2 estão os valores dos limites de quantificação, percentuais de recuperação e repetibilidade dos métodos aplicados a biomassa fúngica.

Tabela 2: Indicativos de eficiência dos métodos de determinação de glicosamina e ergosterol.

Indicativos	Glicosamina	Ergosterol
LOQ (mg/g)	2,3	0,1
Recuperação (%)	102	71
Repetibilidade n CV (%)	8	9

n = média de 3 repetições; CV = coeficiente de variação; LOQ = limite de quantificação

Cabe salientar que são poucos os relatos sobre os indicativos de confiabilidade analítica para estes compostos aplicados a biomassa fúngica. No entanto, Carvalho et al. (2006) apresentaram resultados de recuperação na faixa de 10 a 55% como aceitáveis para a metodologia de extração de ergosterol, o que confirma a eficiência do proposto visto pelos teores mais elevados de recuperação alcançados.

Na Figura 2 está demonstrada a evolução do conteúdo de glicosamina (mg/g de biomassa) no cultivo de *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus flavus* acompanhadas entre o 2º e o 12º dia de incubação.

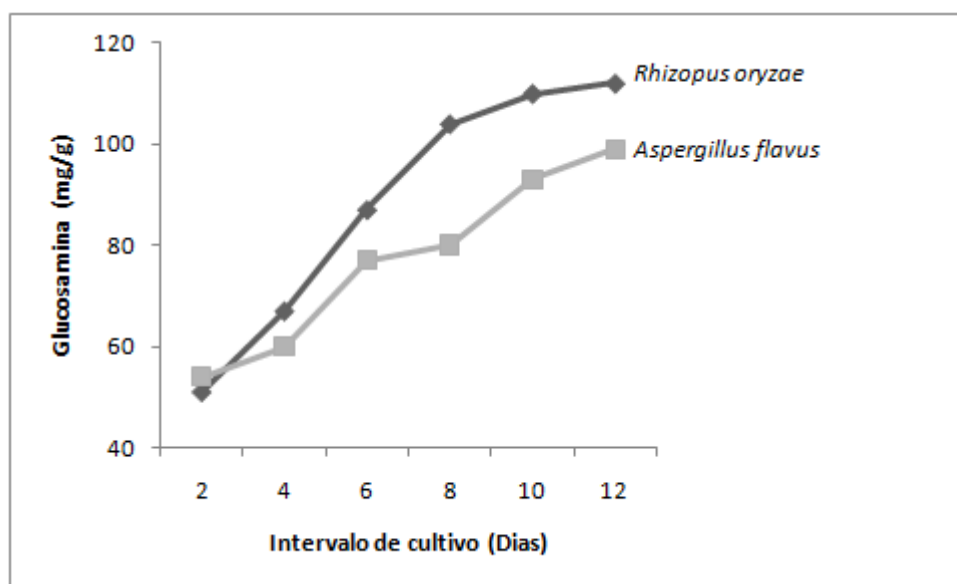


Figura 2: Evolução do conteúdo de glicosamina (mg/g de biomassa seca) de *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus flavus* durante o intervalo de cultivo.

A observação das curvas permite verificar um comportamento linear e crescente até o 12º dia. Este comportamento pode ser descrito matematicamente

pelas equações $y = 12,886x + 43,4$, sendo y o conteúdo de glicosamina e $r = 0,9642$ para o *Rhizopus oryzae* e $y = 9,3429x + 44,467$ e $r = 0,9873$, para o *Aspergillus flavus*, sendo y o conteúdo de glicosamina, ou seja o coeficiente de correlação para o *Aspergillus flavus* foi maior.

As taxas de produção média de glicosamina estimada a partir das curvas são de $19,5 \mu\text{g}_{\text{glicosamina}}/\text{hora}$ para o *Rhizopus oryzae* e de $20,5 \mu\text{g}_{\text{glicosamina}}/\text{hora}$ para o *Aspergillus flavus*, portanto ocorreu uma pequena diferença nas taxas de produção de componentes celulares nos micro-organismos no intervalo estudado.

O aumento no teor de glicosamina foi crescente ao longo de 12 dias de cultivo, conforme o relato de Desgranges et al. (1991) para o cultivo de *Beauveria bassiana*; de Ooijkaas et al. (1998) para o cultivo de *Coniothyrium minitans*; de Gelmi et al. (2000) para o cultivo de *Gibberella fujikuroi* e Nopharatana et al. (2003) para o cultivo de *Rhizopus oligosporus*. No entanto, difere daqueles alcançados por Roche & Durand (1996) para o cultivo de *Thermoascus aurantiacus*, onde o teor de glicosamina foi constante no fungo ao longo do tempo de estudo.

Fenice et al. (2003) encontraram em média $69 \text{ mg glicosamina/g}$ biomassa seca para o *Panus tigrinus*, Kalogeris et al. (2003) em média 61 mg/g para o *Thermoascus aurantiacus* e Scotti et al. (2001) encontraram em média $170 \text{ mg glicosamina/g}$ biomassa seca para o *Cunninghamella elegans*. Estes estudos reforçam que o conteúdo de glicosamina depende do micro-organismo em estudo. Nagel et al. (2001) utilizaram a glicosamina como um indicador de crescimento de *Aspergillus oryzae* cultivado em grãos de trigo. Para isto, os autores utilizaram o sistema *overculture* no qual a glicosamina e a massa seca da biomassa fúngica puderam ser medidas simultaneamente, verificando também que o conteúdo de glicosamina foi crescente ao decorrer do período de avaliação.

Cabe salientar que os textos clássicos também enfatizam que cada espécie fúngica apresenta uma característica própria durante o ciclo de desenvolvimento. No caso dos que foram estudados neste trabalho, eles pertencem a classe zigomicetos (Phicomycetes), o *Rhizopus oryzae* apresenta hifas e ascomiceto (Ascomycetes) para o *Aspergillus flavus* apresenta hifas septadas e tem o processo de reprodução sexuada formando sacos (PANDEY et al., 2000). No entanto, para o componente glicosamina não se observou diferença na produção, pois em qualquer caso o aumento, provavelmente seja causado pela produção da quitina, que pode

permanecer nas hifas “fantasmas” mesmo após a inviabilidade das células (OOIKJAAS et al., 1998).

O teor de ergosterol também varia para diferentes espécies de fungos, na faixa de 1 a 24 mg/g biomassa seca (MONTGOMERY et al., 2000; MATILLA et al., 2002; KLAMER & BAATH, 2004), e como mostra a Figura 3, isto também ocorreu neste trabalho para as duas cepas estudadas entre o 2° e o 12° dia. Os valores encontrados (1 a 3,7 mg/g biomassa seca) estão dentro da faixa esperada para estes tipos de micro-organismos.

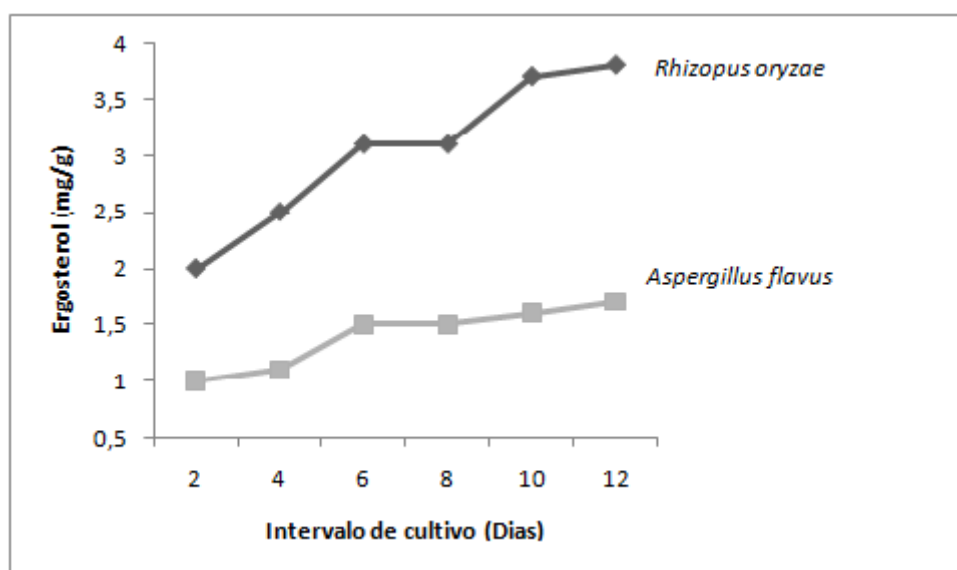


Figura 3: Evolução do conteúdo de ergosterol (mg/g de biomassa seca) de *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus flavus* durante o intervalo de cultivo.

As equações para as curvas de produção de ergosterol em relação ao tempo de cultivo para o *Rhizopus oryzae* foi $y = 0,36x + 1,7733$ e $r = 0,9734$ e para o *Aspergillus flavus* $y = 0,1429x + 0,9$ e $r = 0,9449$, sendo y o conteúdo de ergosterol, ou seja, o maior coeficiente de correlação foi para o *Rhizopus oryzae*. A taxa de produção média de ergosterol estimada a partir das curvas são de $19,8 \mu\text{g}_{\text{ergosterol}}/\text{hora}$ para o *Rhizopus oryzae* e de $19,5 \mu\text{g}_{\text{ergosterol}}/\text{hora}$ para o *Aspergillus flavus*, portanto neste caso também as taxas de produção de ergosterol não difere para os fungos estudados.

O uso de ergosterol como biomarcador para fungos específicos ainda é controverso em decorrência da variação de conteúdo diferente entre espécies decorrente do estado nutricional e estágio de crescimento, podendo resultar em estimativas da biomassa fúngica incorreta, além disso, um possível efeito de poluentes em locais contaminados pode afetar o metabolismo do ergosterol e com isso a

precisão do método. Características estas que não são diferentes de outros indicadores bioquímicos de multiplicação.

Barajas-Aceves et al. (2002) testaram a influência de metais pesados (Cu, Zn e Cd) e uso de fungicidas na massa fúngica formada, e o conteúdo de ergosterol e verificaram que em concentrações que reduzem a atividade metabólica entre 18 a 53%, o conteúdo de ergosterol não foi alterado, com exceção do fungicida zineb que reduziu em 57% o conteúdo de ergosterol na biomassa seca comparado ao grupo controle. Em experimentos de solo com Cobre (80 ppm) e o fungicida Thiram (10 ppm) após 15 e 30 dias de incubação, o teor de ergosterol no solo foi linearmente correlacionado com a biomassa fúngica nele presente, tanto na contaminada como na controle, e verificaram que o conteúdo de ergosterol foi independente da presença ou ausência de poluentes. Desta maneira, os autores concluíram que estes resultados indicam que o ergosterol é um indicador útil para a biomassa fúngica em solos contaminados e além disso, pode ser um indicador aplicado para monitoramento de processos de biorremediação.

As correlações e as equações matemáticas que relacionam a biomassa de cada espécie (x) e a produção dos componentes de parede e membranas celulares (y), estão demonstradas na Tabela 3. Já que não estão disponíveis dados na literatura que correlacionem a produção dos micro-organismos estudados simultaneamente com o conteúdo de glicosamina e ergosterol para estimativa de multiplicação fúngica ou inibição pela utilização de fungicidas. Em vista dos dados, foi calculada uma relação equacionando o conteúdo de glicosamina e ergosterol para os fungos de interesse conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Correlações entre massas secas (g) e os conteúdos de ergosterol e glicosamina (mg) para o *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus flavus*.

	r	Equação
Massa x glicosamina <i>Rhizopus oryzae</i>	0,9912	$Y = 139,9486x - 11,4763$
Massa x glicosamina <i>Aspergillus flavus</i>	0,9688	$Y = 104,7669x - 7,9191$
Massa x ergosterol <i>Rhizopus oryzae</i>	0,9797	$Y = 4,4564x - 0,3185$
Massa x ergosterol <i>Aspergillus flavus</i>	0,9857	$Y = 1,8063x - 0,1131$
Glicosamina x ergosterol <i>Rhizopus oryzae</i>	0,9926	$Y = 0,0318x + 0,0482$
Glicosamina x ergosterol <i>Aspergillus flavus</i>	0,9962	$Y = 0,017x + 0,0304$

X = glicosamina (mg); Y = ergosterol (mg);

Para o *Rhizopus oryzae*, a glicosamina apresentou uma relação maior com a massa fúngica comparado ao *Aspergillus flavus* que foi melhor com o conteúdo de ergosterol. No entanto, os coeficientes de correlações encontrados sugerem uma proporcionalidade confiável entre ambas as variáveis, massa (x) e glicosamina/ergosterol (y).

Esta mesma correlação, entre conteúdo de glicosamina e biomassa seca foi estabelecida por outros autores em cultivo líquido usando a estimativa para determinação da massa celular nos cultivos em meio sólido (AIDOO et al., 1981; BANDELIER et al., 1997; GELMI et al., 2000; SCOTTI et al., 2001; KALOGERIS et al., 2003; FENICE et al., 2003). Outro parâmetro, entretanto, foi utilizado por Gutierrez-Correa & Tengerdy (1998), que correlacionaram o conteúdo de glicosamina com a porcentagem de proteína do micélio seco.

A correlação promissora entre componentes da membrana e parede celular para estas espécies sugerem que a determinação dos mesmos simultaneamente propiciaram a avaliação objetiva da atividade antifúngica de compostos naturais, e a identificação do mecanismo de inibição fúngica por extratos ou óleos essenciais, pois sabe-se que alguns compostos antifúngicos podem exercer seu efeito diretamente sobre a membrana citoplasmática, sem qualquer dano evidente na parede celular e

vice-versa, ou até mesmo, exercer efeito em ambos componentes (SOUZA et al., 2011; TIAN et al., 2012).

4. CONCLUSÃO

A correlação matemática entre a glicosamina e o ergosterol foi de 0,9926 e 0,9962 com a biomassa seca, e 0,9688 e 0,9912 produzidas pela biomassa *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus flavus*, respectivamente, possibilitam medida confiável para avaliação objetiva da multiplicação da biomassa fúngica através de suas quantificações.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

BANDELIER, S.; RENAUD, R.; DURAND, A. Production of gibberellic acid by fed-batch solid state fermentation in an aseptic pilot-scale reactor. **Process Biochemistry**, v. 32, n. 2, p. 141 – 145, 1997.

BARAJAS-ACEVES, M.; HASSAN, M.; TINOCO, R.; VASQUEZ-DUHALT, R. Effect of pollutants on the ergosterol content as indicator of fungal biomass. **Journal of Microbiological Methods**, v. 50, p. 227–236, 2002.

CARVALHO, J. C.; PANDEY, A.; OISHI, B. O.; BRAND, D.; RODRIGUEZ-LÉON, J. A.; SOCCOL, C. R. Relation between growth, respirometric analysis and biopigments production from *Monascus* by solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 29, n. 3, p. 262-269, 2006.

DESGRANGES, C.; VERGOLNAN, C.; GEORGES, M.; DURAND, A. Biomass Estimation in Solid State Fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 200-205, 1991.

FENICE, M.; SERMANNI, G.G.; FEDERICI, F.; D'ANNIBALE, A. Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. **Journal of Biotechnology**, v. 100, p. 77-85, 2003.

GALVÃO, J. G.; GUERREIRO, M. C.; SOUZA, J. A.; COURA, S. M. Uso do fungo *Fusarium oxysporum* como indicador de ametrina, através da medida de biomassa, pela quantificação do ergosterol. **Ciência e agrotecnologia**, v. 27, n.4, p. 840-845, 2003.

GELMI, C.; PÉREZ-CORREA, R.; GONZÁLEZ, M.; AGOSIN, E. Solid substrate cultivation of *Gibberella fujikuroi* on an inert support. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1227-1233, 2000.

GESSNER, M.O.; CHAUVET, E. Growth and production of aquatic hyphomycetes in decomposing leaf litter. **Limnology & Oceanography**, v. 42, p. 496-505, 1997.

GESSNER, M.O.; SCHWOERBEL, J. Fungal biomass associated with decaying leaf litter in a stream. **Oecologia**, v. 87, p. 602-603, 1991.

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

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.

GUTIERREZ-CORREA, M.; TENDERDY, R.P. Xylanase production by fungal mixed culture solid substrate fermentation on sugar cane bagasse. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 1, p. 45-47, 1998.

HAQ, I. U.; ALI, S.; IQBAL, J. Effect of volume of culture medium on enhanced citric acid productivity by a mutant culture of *Aspergillus niger* in stirred fermentor. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, p. 302-306, 2003.

KALOGERIS, E.; INIOTAKI, F.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B.J. Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 86, p. 207-213, 2003.

KLAMER M.; BÅÅTH E. Estimation of conversion factors for fungal biomass determination in compost using ergosterol and PLFA 18:2_6,9. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 36, p. 57-65, 2004.

MARTIN, F.; DELARUELLE, C.; HILBERT, J. L. Na improved ergosterol assay to estimate fungal biomass in ectomycorrhizas. **Mycological Research**, v. 94, n. 9, p. 1059-1064, 1990.

MATILLA P.; LAMPI A.M.; RONKAINEN R.; TOIVO J.; PIIRONEN V. Sterol and vitamin D₂ contents in some wild and cultivated mushrooms. **Food Chemistry**, v. 76, p. 293-298, 2002.

MONTGOMERY H.J.; MONREAL C.M.; YOUNG J.C.; SEIFERTD K.A. Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, p. 1207-1217, 2000.

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

NAGEL, F. J. I.; TRAMPER, J.; BAKKER, M. S. N.; RINZEMA, A. Temperature Control in a Continuously Mixed Bioreactor for Solid-State Fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, p. 219-230, 2001.

NEMEC, T.; JERNEJC, K.; CIMERMAN, A. Sterols and fatty acids of different *Aspergillus* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 149, p. 201-205, 1997.

NOPHARATANA, M.; MITCHELL, D. A.; HOWES, T. Use of confocal microscopy to follow the development of penetrative hyphae during growth of *Rhizopus oligosporus* in an artificial solid-state fermentation system. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, n. 4, p. 438-447, 2003.

OOIJKAAS, L.P.; TRAMPER, J.; BUITELAAR, R.M. Biomass estimation of *Coniothyrium minitans* in solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 480-486, 1998.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: l-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153-1169, 2000.

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

ROCHE, N.; DURAND, A. Kinetics of *Thermoascus auranticus* Solid-State Fermentation on Sugar-Beet Pulp – Polysaccharide Alteration and Production of related Enzymatic Activities. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 45, p. 584-588, 1996.

SCOTTI, C.T.; VERGOIGNAN, C.; FERON, G.; DURAND, A. Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans*

grown in solid state cultivation conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 7, p. 1-5, 2001.

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

SPARRINGA, R.A.; OWENS, J.D. Glucosamine content of tempe mould, *Rhizopus oligosporus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.47, p.153-157, 1999.

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

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, 520-527, 2012.

TOMASELLI-SCOTTI, C.; VERGOIGNAN, C.; FERON, G.; DURAND, A. Glucosamine Measurement as Indirect Method for Biomass Estimation of *Cunninghamella elegans* Grown in Solid State Cultivation Conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 7, p. 1-5, 2001.

ARTIGO 2

Inibição da produção de biomassa *Rhizopus oryzae* na presença de extratos fenólicos de *Spirulina platensis* e *Chlorella* sp.

Michele Moraes de Souza, Eliana Badiale-Furlong

RESUMO

Os compostos fenólicos vêm sendo estudados pelo seu possível uso na indústria de alimentos como conservadores naturais, também para evitar a contaminação fúngica. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi estudar metodologia de extração de compostos fenólicos das microalgas *Spirulina platensis* e *Chlorella* sp. e relacionar com a atividade antifúngica testada contra o fungo *Rhizopus oryzae*. Os compostos fenólicos foram extraídos com metanol e quantificados colorimetricamente com reagente de Folin-Ciocalteu. O método para avaliar a atividade antifúngica empregou a técnica de ágar diluído e quantificação da biomassa fúngica formada pelas determinações de glicosamina e ergosterol. A *Spirulina platensis* apresentou maior aporte fenólico em relação a *Chlorella* sp. O *Rhizopus oryzae* teve seu desenvolvimento inibido em presença de extratos metanólicos de *Chlorella* sp. e de *Spirulina platensis*. Houve inibição do conteúdo de ergosterol e glicosamina do *Rhizopus oryzae* de 20% usando extrato de *Chlorella* sp. e de 50% usando o extrato de *Spirulina platensis*. Ficou demonstrada a inibição da produção de parede e membrana celular na biomassa *Rhizopus oryzae* pelos extratos.

Palavras-chave: ergosterol, fenóis, glicosamina, inibição fúngica, *Rhizopus oryzae*

ABSTRACT

Phenolic compounds have been studied for its possible use in the food industry as a natural conservative, also to avoid fungal contamination. Given this, the aim was to study methods of extraction of phenolic compounds from microalgae *Spirulina platensis* and *Chlorella* sp. and relate the antifungal activity tested against the fungus *Rhizopus oryzae*. Phenolic compounds were extracted with methanol and quantified colorimetrically with Folin-Ciocalteau. The method to evaluate the antifungal activity employed the technique of agar diluted and quantification of fungal biomass formed by the determination of glucosamine and ergosterol. *Spirulina platensis* showed a higher phenolic intake in relation to *Chlorella* sp.. The development *Rhizopus oryzae* was inhibited in the presence of methanol extracts of *Chlorella* sp. and *Spirulina platensis*, inhibiting an average of 20% content of ergosterol and glucosamine using microalgae extract of the first and second in average 20%. Been shown to inhibit the production of wall and cell membrane in biomass by *Rhizopus oryzae* extracts.

Keywords: ergosterol, phenols, glucosamine, inhibit fungal, *Rhizopus oryzae*.

1. INTRODUÇÃO

Os fungos são agentes biológicos oportunistas de natureza ubíqua que colonizam os alimentos por causa de seu poderoso arsenal de enzimas hidrolíticas, que podem causar deterioração dos alimentos e conseqüentemente perdas nutricionais, sensoriais e econômicas (KUMAR et al., 2010).

Os efeitos indesejáveis de conservantes químicos e as restrições das indústrias de alimentos sobre a sua aplicação como aditivos alimentares têm aumentado o interesse em buscar alternativas de agentes antimicrobianos e antifúngicos naturais para as diferentes etapas da produção, desde o cultivo até a distribuição e consumo. Além disso, ao longo das últimas décadas, tem havido uma crescente demanda dos consumidores por alimentos desprovidos de conservantes sintéticos, abrindo espaço para emprego de princípios ativos de origem vegetal ou microbiana, sendo reconhecidos mundialmente como aditivos alimentares seguros denominados GRAS (Generally Recognized As Safe) em diferentes países desenvolvidos (MELO & GUERRA, 2002; KUMAR et al., 2010; TIAN et al., 2012),

Apesar da abundante literatura sobre conteúdo fenólico em matrizes vegetais e microbianas (COLLA et al., 2007; LI et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007; SOUZA et al., 2010; 2011), poucos são os trabalhos que descrevem adaptações do procedimento para extração em matrizes específicas e/ou condições críticas de preparo de amostra para a quantificação. Cabe ressaltar que o processo de extração para distintas matrizes e analitos é fundamental para a estimativa mais exata de compostos fenólicos para diferentes fins (BADIALE-FURLONG et al., 2003; SOUZA et al., 2009).

Espécies de *Spirulina* e *Chlorella* têm sido utilizadas mundialmente na alimentação humana e animal, por serem micro-organismos (GRAS). Suas propriedades nutricionais têm sido relacionadas com possíveis atividades terapêuticas, principalmente pelo seu aporte fenólico, caracterizando-as no âmbito dos alimentos funcionais e nutracêuticos. Alguns pesquisadores tem estudado também seu potencial como antimicrobiano e antifúngico (SOUZA et al., 2011; TANTAWY, 2011; ABEDIN & TAHA, 2008).

À microalga *Chlorella* são atribuídas ações biológicas identificadas, mas às suas propriedades como conservante são pouco exploradas (DERNER et al., 2006). Considerando que os recursos hídricos naturais da região Sul do Rio Grande do Sul são adequados para o cultivo das microalgas, a demonstração deste potencial poderá

vir a ser mais um subsídio para a consolidação do cultivo das mesmas em larga escala no ecossistema costeiro local (SOUZA et al., 2010).

A *Spirulina platensis* apresenta propriedades antioxidantes e antimutagênicas, devido a presença de compostos fenólicos, favorecendo o seu uso como alimento funcional, porém há poucas evidências na literatura sobre sua atividade antifúngica (ABEDIN & TAHA, 2008; SOUZA et al., 2011; TANTAWY, 2011).

Para acompanhar a contaminação fúngica ou sua inibição a partir de diferentes tecnologias, são empregados métodos indiretos que monitoram componentes específicos do metabolismo fúngico, de forma relativamente simples. No entanto estas apresentam limitações, pelo fato dos teores dos diferentes componentes celulares sofrerem modificações significativas ao longo do ciclo biológico destes micro-organismos (OOIJKAAS et al., 1998). A glicosamina, o ergosterol, as proteínas e os ácidos nucleicos, ou medidas da atividade biológica, como por exemplo a respiração, são muito empregadas para esta avaliação. Estas técnicas propiciam rapidez e menor número de experimentos se comparadas aos métodos microbiológicos de enumeração quando aplicadas na fase exponencial do crescimento fúngico.

Neste trabalho, o objetivo foi estudar a extração de compostos fenólicos da *Spirulina platensis* e de *Chlorella* sp. utilizando planejamento experimental, e desta forma subsidiar estudos de atividade antifúngica destes compostos sobre a produção de biomassa por *Rhizopus oryzae*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Procedimentos experimentais gerais

Todos os solventes e reagentes utilizados durante os testes foram analiticamente puros (P.A). O reagente Folin-Ciocalteu foi adquirido da Polipur (Pró-análise Química e Diagnóstico Ltda) e o padrão de ácido gálico da Sigma-Aldrich Chemical. As medidas de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro modelo VARIAN CARY/100 UV-VISIBLE.

2.2 Micro-organismos

O micro-organismo utilizado neste trabalho foi o fungo filamentoso *Rhizopus oryzae* CCT 7560 depositado na coleção de culturas da Fundação Tropical de Pesquisa André Tosello, Campinas – SP, Brasil. A cultura foi mantida em Agar Batata Dextrose (BDA) a 30 °C durante 7 dias até a completa esporulação.

As suspensões de esporos utilizadas foram obtidas após a propagação em meio BDA, seguida de recuperação dos esporos do meio com solução 0,2% Tween 80, filtração e enumeração de esporos em câmara de Neubauer, padronizando a solução de trabalho para 4×10^6 esporos/mL.

A cianobactéria *Spirulina platensis* foi fornecida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) e armazenada durante 60 dias em recipientes plásticos sob refrigeração, até o momento da extração dos compostos fenólicos. A *Spirulina platensis* foi isolada da Lagoa Mangueira e cultivada em uma planta piloto localizada perto da costa dessa lagoa, constituída por três tanques revestidos com fibra, agitados por pás, localizados no interior de uma estufa de filme de polietileno transparente. A cultura foi adicionada aos tanques de produção, em quantidade suficiente para uma produção inicial de 10.000 L em cada tanque. O cultivo foi sob luz natural no tanque por 387 dias. A biomassa de *Spirulina platensis* foi retirada dos tanques, seca em estufa a 90 °C e triturada em moinho de facas (COSTA et al., 2002; COSTA et al., 2004; MORAIS et al., 2009).

A microalga *Chlorella* sp., foi fornecida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG, mantida e cultivada em meio BG-11, contendo (g/L): NaNO_3 (1,50); $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0,04); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,075); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,036); Citrato Férrico (0,006); EDTA (0,001); Na_2CO_3 (0,02); Ácido Cítrico (0,006) e micronutrientes (HENRARD, 2009). Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores abertos tipo *raceway* de 6 L com 5 L de volume útil e concentração celular inicial 0,20 g/L. A agitação dos cultivos foi realizada através de bombas submersas com vazão de 60 L/h fixadas nos fotobiorreatores. A iluminância foi de 3200 Lux fornecida por lâmpadas fluorescentes tipo luz do dia (40 Watts). O aparato experimental foi mantido durante 40 dias em câmara termostaticada não estéril a 30 °C, com fotoperíodo de 12 h claro/escuro (REICHERT et al., 2006).

2.3 Estudo das condições de extração dos compostos fenólicos totais (CFT) das microalgas

A partir de condições estudadas por Colla et al. (2007), Li et al. (2007) e Souza et al. (2009), foi utilizado um planejamento fatorial 2^3 com pontos centrais onde foram avaliados os efeitos das variáveis: intervalo de extração (120, 135 e 150 minutos), rotação (100, 150 e 200 rpm) e extração com e sem interrupções na etapa de agitação (0, 15 e 30 minutos), resultando em 11 experimentos para cada microalga, tendo-se como resposta o CFT.

Foram pesados 2 gramas de microalga seca e adicionados 10 mL de metanol seguido de agitação em mesa agitadora orbital TE - 141 (TECNAL) sob temperatura ambiente. Os extratos foram filtrados e clarificados com 5 mL de hidróxido de bário 0,1M e 5 mL de sulfato de zinco 5%. As soluções foram filtradas e transferidas quantitativamente para um balão volumétrico de 25 mL, sendo o volume final completado com o metanol.

A determinação quantitativa dos compostos fenólicos nos extratos foi realizada por espectrofotometria de UV/VIS utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. O procedimento consistiu em tomar alíquotas de 500 µL de cada extrato, agitar com 500 µL de água destilada e 4,5 mL de Na₂CO₃ 4% por 1 min, colocado em banho-maria a 37 °C por 15 min. As misturas foram agitadas por 30 segundos em banho ultra-som com 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído 1:2 com água destilada. Após 10 min, foi medida a absorvância das soluções em comprimento de onda de 750 nm. O conteúdo de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorvância das amostras a partir de uma curva analítica construída com uma solução padrão de ácido gálico contendo 100 µg/mL da qual foram preparadas diluições variando entre 2 e 30 µg/mL. Os resultados dos conteúdos fenólicos das amostras foram expressos como µg de equivalente de ácido gálico (GAE)/g de microalga.

2.4 Teste de atividade antifúngica

A atividade antifúngica foi determinada pelo método bioanalítico *in vitro* acompanhando o desenvolvimento do micro-organismo em presença e ausência dos extratos fenólicos das microlagas. O meio de cultura (BDA) foi preparado com os cuidados assépticos e em cada placa foram adicionados os extratos fenólicos, sendo adicionados para o extrato metanólico de *Spirulina platensis* e *Chlorella* sp., 100 µg fenóis/mL de meio. Em seguida, foram acrescentados em todas as placas 15 mL do meio (BDA), homogeneizando para distribuir os extratos fenólicos no meio (BDA), sempre observando as condições assépticas (Câmara de Fluxo Laminar LABCONCO modelo 36210, tipo B2). Nas placas controle, os extratos foram substituídos pela mesma quantidade de água estéril, adicionada antes do meio de cultura. Após a solidificação, foram adicionados ao centro das placas 26 µL da solução de esporos contendo 4x10⁶ esporos/mL. A incubação ocorreu em câmara de germinação modelo Tecnal TE – 403, a temperatura de 30 °C durante 10 dias. Todas as condições foram estudadas em triplicata.

2.5 Quantificação da biomassa fúngica

2.5.1 Determinação da biomassa seca do micélio

As placas de Petri inoculadas com *Rhizopus oryzae* foram retiradas no 2°, 4°, 6°, 8° e 10° dias de incubação e congeladas a -18 °C. O micélio foi separado do meio de cultura e a massa seca foi determinada em estufa a 70 °C até peso constante.

2.5.2 Determinação de ergosterol

A solução padrão de ergosterol foi preparada a partir de uma solução contendo 0,3 mg de ergosterol em 1 mL de metanol (Sigma, Estados Unidos, pureza mínima de 90%). Esta foi diluída para obter as soluções de trabalho nas concentrações entre 1,5 e 16,5 µg de ergosterol/mL metanol. As absorvâncias das soluções foram medidas a 283 nm em espectrofotômetro de feixe duplo modelo Varian 100, obtendo-se uma curva de calibração para estimativa do analito.

Foi empregado o método modificado de Gutarowska e Zakowska (2009) para determinar o conteúdo de ergosterol na biomassa seca e homogeneizada. O procedimento consistiu em homogeneizar 0,2 g da biomassa fúngica com 10 mL de metanol sob agitação orbital a 200 rpm por 30 minutos. A fração metanólica foi separada e ao resíduo da biomassa fúngica foram adicionados mais 10 mL de metanol seguindo-se mais 20 minutos de agitação. Os sobrenadantes metanólicos foram homogeneizados e centrifugados a 3000 g a 20 °C por 10 min. Ao sobrenadante da mistura centrifugada foram adicionados 20 mL de KOH/metanol, aquecido sob refluxo por 30 minutos e resfriado a 4 °C. A mistura refluxada foi submetida a quatro partições com 20 mL de hexano cada uma. As frações hexânicas foram homogeneizadas e evaporadas em rotaevaporador a 60 °C e 40 rpm. O resíduo foi dissolvido com 10 mL de metanol e a absorvância determinada a 283 nm em espectrofotômetro. O conteúdo de ergosterol foi estimado a partir da curva de calibração e expresso em mg/g de biomassa seca.

2.5.3 Determinação de glicosamina

A solução padrão de glicosamina apresentou 0,1 mg de glicosamina/mL de água. Esta foi diluída para obter as concentrações entre 3,0 e 20,0 µg de glicosamina por mL. As absorvâncias das soluções foram medidas a 530 nm em espectrofotômetro, e a absorvidade da glicosamina dada pela declividade da curva padrão.

A 0,2 g de biomassa seca, foram adicionados 5 mL de HCl 6M seguido de autoclavagem a 121 °C e 1,1 atm, durante 8 min. A mistura foi resfriada e filtrada para balão volumétrico de 5 mL e o volume completado com água destilada sendo 1 mL transferido para balão volumétrico de 25 mL e neutralizando com solução de NaOH 3M, usando fenolftaleína 0,5% como indicador. Foi realizada a titulação reversa com KHSO₄ 1% (m/v), até o desaparecimento da coloração rosa completando o volume do balão com água destilada.

Após a extração, 1 mL da solução foi transferida para tubos de ensaio, aos quais foram adicionados 1 mL da solução de acetil-cetona em 50 mL de Na₂CO₃ 0,5N, seguido por aquecimento em banho de água fervente por 20 min. As amostras foram resfriadas e adicionados 6 mL de etanol e 1 mL de reagente de Erlich (2,67g DAB - p_dimetilaminobenzaldeído - dissolvido em 15 mL de etanol e 15 mL de ácido clorídrico). Os tubos reatores foram incubados a 65 °C em estufa durante 10 min. A absorvância foi lida em espectrofotômetro a 530nm e o teor de glicosamina determinado através da absortividade da glicosamina estimada pela curva padrão (AIDDO et al.,1981).

2.6 Análise estatística

Para análise estatística dos dados foi utilizado o programa Statistica 7.0, considerando o conteúdo de fenóis totais (μg ácido gálico/g microalga) como resposta das variáveis em estudo, utilizando um intervalo de confiança de 95%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para estudo das melhores condições de extração dos compostos fenólicos das microalgas foi utilizado o planejamento experimental para possibilitar a inferência estatística e fornecer informações sobre o comportamento das respostas entre os níveis das variáveis em estudo, evidenciando a repetibilidade e minimizando custos e tempo ao não se repetir todos os experimentos, demanda e desgaste de equipamento, menor exposição do analista e menor volume de descarte (NETO et al., 2003; RODRIGUES & IEMMA, 2005).

As variáveis tempo de extração, rotação e tempo com e sem interrupções de processo, foram estudadas em um planejamento completo 2³ com três pontos centrais para obtenção da melhor combinação das variáveis para extração dos compostos fenólicos (Tabela 1). O comportamento verificado permitiu conhecer as melhores condições nas faixas estudadas para extração dos fenóis. Estas são conhecidas como as que mais afetam a recuperação dos compostos fenólicos totais ou para posterior

separação das diferentes famílias deles, a partir de matrizes vegetais e microbianas (SOUZA et al., 2009).

Tabela 1: Matriz do planejamento fatorial (DCC) com valores codificados (reais) e respostas obtidas para o conteúdo de fenóis totais ($\mu\text{g}_{\text{GAE/g}_{\text{microalga}}}$).

Ensaio	Interrupções na agitação (X_1) (min)	Rotação (X_2)(rpm)	Tempo (X_3) (min)	CFT <i>Spirulina platensis</i>	CFT <i>Chlorella</i> sp.
1	0(-1)	100(-1)	120(-1)	647,04	473,92
2	30(+1)	100(-1)	120(-1)	625,79	488,15
3	0(-1)	200(+1)	120(-1)	891,59	680,12
4	30(+1)	200(+1)	120(-1)	626,50	410,11
5	0(-1)	100(-1)	150(+1)	1052,1	399,65
6	30(+1)	100(-1)	150(+1)	998,82	422,67
7	0(-1)	200(+1)	150(+1)	1174,03	590,54
8	30(+1)	200(+1)	150(+1)	759,93	532,77
9	15(0)	150(0)	135(0)	754,41	473,98
10	15(0)	150(0)	135(0)	723,97	499,01
11	15(0)	150(0)	135(0)	765,87	480,15

CFT: Compostos fenólicos totais

Com relação ao conteúdo de CFT, ambas as microalgas estudadas apresentaram diferença significativa nos seus resultados em função das variáveis testadas, variando de 647 a 1174 $\mu\text{g}_{\text{GAE/g}_{\text{microalga}}}$ na *Spirulina platensis* e de 399 a 680 $\mu\text{g}_{\text{GAE/g}_{\text{microalga}}}$ na *Chlorella* sp confirmando a importância de se estudar as variáveis determinantes na extração dos CFT.

A Tabela 2 apresenta os resultados da análise estatística dos efeitos estudados no planejamento 2^3 , que confirmaram o efeito das associações de condições de extração demonstrada pelos conteúdos obtidos em fenóis totais nos diferentes

experimentos. Outros autores também mencionaram estas variações e atribuíram a formas químicas distintas de fenóis presentes na matriz (LIMA et al., 2004; OLIVEIRA & BADIALE-FURLONG, 2008; SOUZA et al., 2009).

Tabela 2: Efeitos e coeficientes para as variáveis obtidas pelo tratamento estatístico para a *Spirulina platensis* e *Chlorella* sp.

	<i>Spirulina platensis</i>			<i>Chlorella</i> sp.		
	Efeito	Desvio padrão	p	Efeito	Desvio padrão	p
Média/Interação	820,005	6,52911	0,000063	495,5518	3,931746	0,000063
(1)INTERVALO(L)	-188,430	15,31213	0,006539*	-72,6325	9,220762	0,015737*
(2)ROTAÇÃO (L)	32,075	15,31213	0,171199	107,2875	9,220762	0,007306*
(3)TEMPO(L)	298,490	15,31213	0,002621*	-26,6675	9,220762	0,101651
1L com 2L	-151,165	15,31213	0,010105*	-91,2575	9,220762	0,010056*
1L com 3L	-45,260	15,31213	0,097932	55,2575	9,220762	0,026734*
2L com 3L	-90,555	15,31213	0,027422*	43,2075	9,220762	0,042650*

*Valores significativos quando $p < 0,05$

Com relação ao conteúdo de fenóis totais na *Spirulina platensis*, a variável interrupção na agitação ($p = 0,006539$) apresentou efeito negativo ao passar de 0 para 30 min, tempo de agitação apresentou efeito positivo ao aumentar de 120 para 150 minutos ($p = 0,002621$), ou seja o maior tempo resulta em maior recuperação de CFT e ambas foram estatisticamente significativas ao nível de confiança de 95%. Para a microalga *Chlorella* sp., o intervalo de repouso apresentou efeito negativo ao passar de 0 a 30 min, a rotação apresentou efeito positivo na média ao passar de 100 para 200 rpm, o tempo não foi significativo ao nível de confiança de 95%. Assim demonstrado, pode-se concluir que os compostos de interesse estão compartimentalizados na célula.

As variáveis interrupções na etapa de agitação (min), tempo de extração (min), interação do intervalo de interrupções de processo com a rotação foram significativas

no intervalo de confiança de 95%, sendo utilizadas para análise da extração de CFT da *Spirulina platensis*. Com relação a *Chlorella* sp., todas as interações e variáveis foram significativas, com exceção do tempo de extração.

A Tabela 3 apresenta as variáveis que foram significativas ao nível de confiança de 95% por meio de análise de variância (ANOVA) para o extrato fenólico de *Spirulina platensis* e a Tabela 4 para o extrato de *Chlorella* sp.

Tabela 3: ANOVA do planejamento experimental para o extrato fenólico de *Spirulina platensis*.

Fonte de variação	Soma quadrática	Grau Liberdade	Média quadrática	Teste F	F _{tab (95%)}	F _{calc/Ftab}
Regressão	30140,1	6	5023,3	15,49	4,53	3,41
Resíduo	311306,5	4	77826,6			
Falta de ajuste	29202,3					
Erro puro	937,8					
Total	341446,6	10				

Tabela 4: ANOVA para planejamento experimental para o extrato fenólico de *Chlorella* sp.

Fonte de variação	Soma quadrática	Grau Liberdade	Média quadrática	Teste F	F _{tab (95%)}	F _{calc/Ftab}
Regressão	7451,23	5	1490,2	8,06	5,05	1,59
Resíduo	60068,59	5	12013,7			
Falta de ajuste	7111,14					
Erro puro	340,09					
Total	67519,82	10				

Os resultados do teste F para o extrato de *Spirulina platensis*, mostraram que o F calculado foi 3 vezes maior que o F tabelado (modelo preditivo), permitindo que o modelo da Equação 1 fosse utilizado para gerar superfície de resposta (Figura 1), em função deste ser preditivo e significativo (coeficiente de correlação = 0,9548).

$$\text{Conteúdo de fenóis } (\mu\text{g}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{S.platensis}}) = 820 - 94,2X_1 + 149,2X_3 - 75,5X_1 \cdot X_2 - 45,2X_2 \cdot X_3 \quad (1)$$

Sendo: X_1 = intervalo de descanso (min); X_2 = rotação (rpm), X_3 = tempo (min)

Para o extrato fenólico da microalga *Chlorella* sp., apesar do F calculado ter sido 1,59 foi gerada superfície de resposta para melhor estudo da combinação das variáveis (Figura 2), sendo o modelo significativo (coeficiente de correlação = 0,9432).

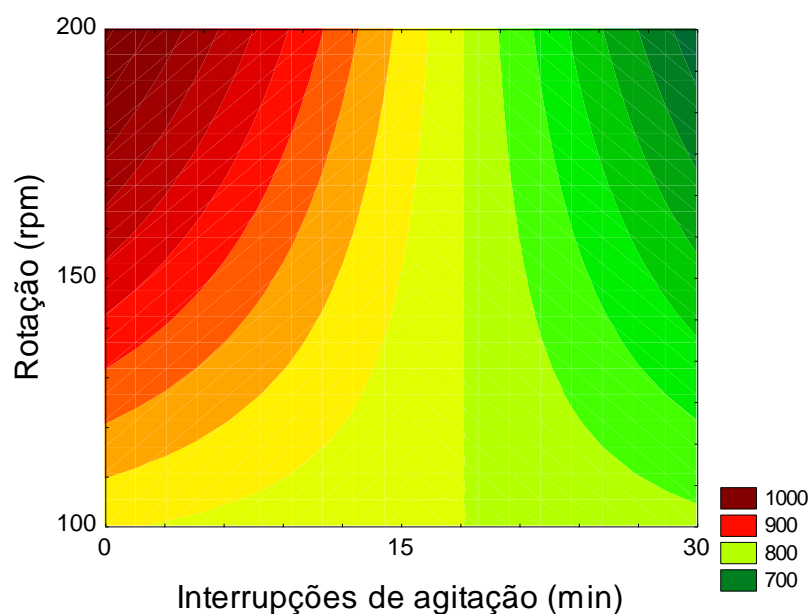


Figura 1: Curva de contorno para CFT da *Spirulina platensis*

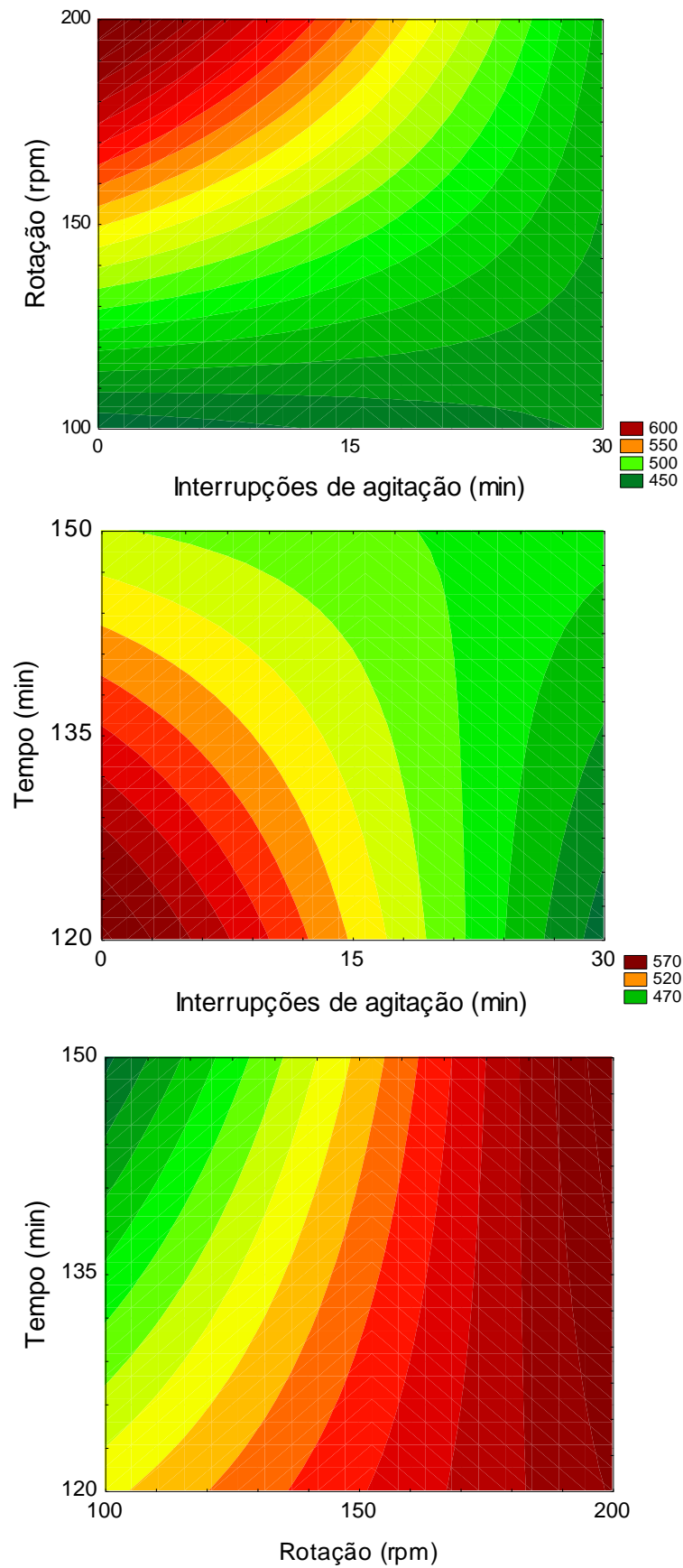


Figura 2: Curvas de contorno para CFT da *Chlorella sp.*

A Figura 1 mostra que o rendimento da extração dos CFT da *Spirulina platensis* foi maior quando foi utilizada a máxima rotação (200 rpm) e o menor intervalo de interrupções no processo de extração (0 minutos), sendo extraídos até 900 µg CFT/g

Spirulina platensis.

A Figura 2 mostra que o rendimento da extração dos CFT da *Spirulina platensis* foi maior quando foi utilizada a máxima rotação (200 rpm), o menor intervalo de interrupções no processo de extração (0 minutos) e o menor tempo de extração (120 min), sendo extraídos até 5700 µg CFT/g *Chlorella sp.*

As microalgas estudadas apresentaram comportamentos diferentes no estudo de suas variáveis. Estes resultados confirmam a importância de se estudar as variáveis da extração de compostos fenólicos em diferentes matrizes.

Após padronização da metodologia de extração dos CFT das microalgas, os extratos foram aplicados para estudo de seus potenciais como inibidores do desenvolvimento de *Rhizopus oryzae*.

A Tabela 5 apresenta os níveis de biomassa seca resultante do desenvolvimento dos fungos até o 10^o dia de experimento e a significância de suas diferenças, no tratamento controle e no tratamento com a presença dos extratos fenólicos.

Tabela 5: Biomassa (gramas) de *Rhizopus oryzae* durante os experimentos.

Extrato	Dias				
	2 ^o	4 ^o	6 ^o	8 ^o	10 ^o
Controle	0,10 ^{a,A}	0,13 ^{b,C}	0,20 ^{c,D}	0,28 ^{d,D}	0,30 ^{d,F}
<i>S.platensis</i>	0,04 ^{a,B}	0,06 ^{a,A}	0,10 ^{b,A}	0,16 ^{c,E}	0,19 ^{c,G}
<i>Chlorella sp.</i>	0,08 ^{a,A}	0,11 ^{b,C}	0,21 ^{c,D}	0,25 ^{d,E}	0,27 ^{d,F}

Letras minúsculas na mesma linha não diferem estatisticamente do controle ($p < 0,05$) para cada biomassa.

Letras maiúsculas na mesma coluna não diferem estatisticamente do controle ($p < 0,05$) para cada dia.

O extrato da *Spirulina platensis* ocasionou uma produção de biomassa fúngica menor significativamente em relação ao tratamento controle e a *Chlorella sp.*, em todos os dias de experimento, mostrando a sua eficácia em inibir o desenvolvimento da biomassa de *Rhizopus oryzae*. Este mesmo efeito foi verificado por Souza et al. (2010) quando estudaram a inibição da multiplicação do micélio de *Rhizopus oryzae*

por extrato de *Chlorella phyrenoidosa* e também não encontraram inibição fúngica com a adição do extrato da microalga deste gênero.

A quantificação da biomassa de *Rhizopus oryzae*, foi determinada através da medida dos teores de glicosamina e ergosterol formados no decorrer do intervalo de incubação da cultura. As Figuras 3 e 4 ilustram a evolução do conteúdo de componentes estruturais em presença e ausência dos extratos das microalgas.

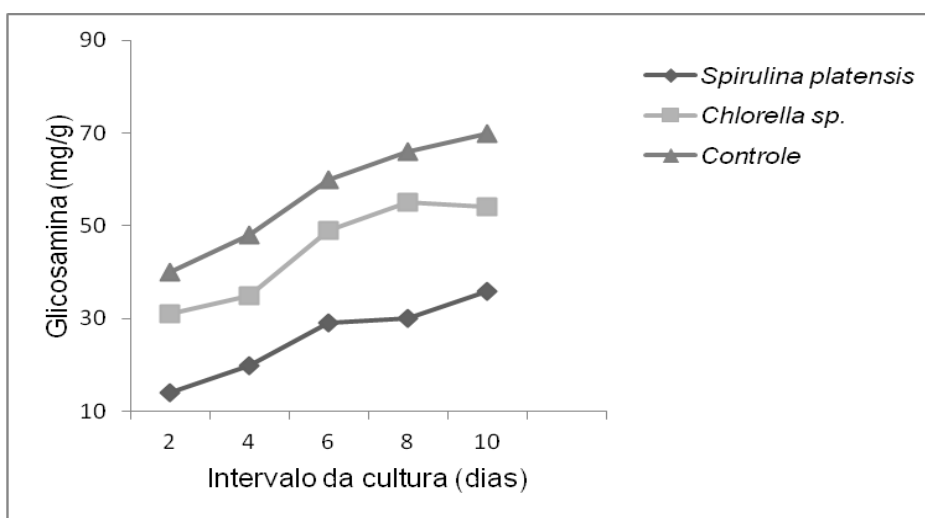


Figura 3: Conteúdo de glicosamina dos tratamentos com e sem a adição dos extratos fenólicos das microalgas.

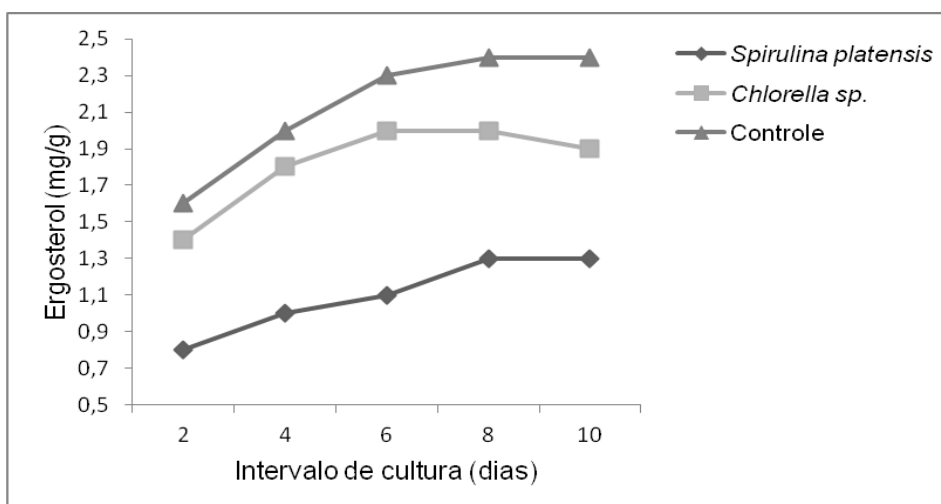


Figura 4: Conteúdo de ergosterol dos tratamentos com e sem a adição dos extratos fenólicos das microalgas.

Houve uma diminuição no conteúdo de glicosamina e ergosterol na presença dos extratos de ambas as microalgas. Isto foi confirmado ao calcular a taxa de produção de glicosamina e ergosterol na presença e ausência dos extratos fenólicos das microalgas. Esta taxa foi calculada pela derivada do conteúdo de glicosamina (mg) pelo intervalo de cultivo (dias). O CFT de *Spirulina platensis* apresentou uma taxa de produção de glicosamina de 2,75 mg/dia e a *Chlorella* sp. de 2,88 mg/dia, enquanto que o grupo controle apresentou uma taxa de 3,75 mg/dia. Para o conteúdo de ergosterol a taxa dos CFT de ambas microalgas foi a mesma, 0,0625 mg/dia e para o grupo controle foi de 0,1mg/dia. Estes resultados permitem estimar a diminuição da velocidade de contaminação quando estes extratos forem aplicados como antifúngicos naturais para estabelecer a vida-de-prateleira produtos onde eles sejam empregados.

As porcentagens de inibição fúngica levando em conta o conteúdo de ergosterol e glicosamina, nos tratamentos com e sem a adição dos CFT estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6: Inibição do *Rhizopus oryzae* (%) pelo conteúdo de glicosamina e ergosterol.

Extrato	2 ^o		4 ^o		6 ^o		8 ^o		10 ^o	
	G	E	G	E	G	E	G	E	G	E
<i>S.platensis</i>	65	50	58	50	52	52	54	46	49	46
<i>Chlorella</i> sp.	23	13	27	10	19	13	17	17	23	21

G = conteúdo de glicosamina; E = conteúdo de ergosterol

A estimativa de porcentagem de inibição da produção de biomassa pelos compostos fenólicos de *Spirulina platensis* e *Chlorella* sp., confirma a maior eficiência do extrato de *Spirulina platensis*. No entanto é interessante observar que afeta em percentual semelhante a diminuição da produção de glicosamina e ergosterol resultando numa média de 50% para ambos. O extrato fenólico de *Chlorella* por sua vez inicialmente afeta mais a produção de ergosterol, o que mostra que eles atuam de forma diferente sobre o metabolismo fúngico, possivelmente em decorrência do tipo de composto fenólico presente na microalga. Cabe observar também que aparentemente o micro-organismo supera esta inibição no 8^o dia de cultivo, mesmo não atingindo seu potencial de desenvolvimento. Tal comportamento permite classificar os CFT dos extratos como fungistáticos.

Ficou demonstrado que a determinação de glicosamina e ergosterol são indicadores para monitorar o desenvolvimento da biomassa de *Rhizopus oryzae*, pois a evolução deles ao longo do cultivo mostrou variação semelhante a determinação gravimétrica da biomassa.

4. CONCLUSÃO

O planejamento experimental realizado mostrou que a melhor combinação das variáveis tempo, rotação e continuidade do processo podem ser previstas por um modelo matemático confiável e significativo. Os extratos fenólicos das microalgas *Spirulina platensis* e *Chlorella* sp. podem inibir a produção de biomassa por *Rhizopus oryzae* sendo o primeiro mais eficiente como inibidor de produção de membrana em até 58% de inibição e parede celular em aproximadamente 60%.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

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

ABEDIN, R.M.A.; TAHA, H.M. Antibacterial and antifungal activity of cyanobacteria and green microalgae, evaluation of medium components by Plackett-Burmann Design for antimicrobial activity of *Spirulina platensis*. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v. 3, n. 1, p. 22-31, 2008.

BADIALE-FURLONG, E.; COLLA, E.; BORTOLATO, D S.; BAISH, A L M.; SOUZA-soares, L A. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. **Revista Vetor**, v. 4, n. 13, p. 105-14, 2003.

COLLA, L. M.; BADIALE-FURLONG, E.; COSTA, J.A.V. Antioxidant Properties of *Spirulina (Arthospira) platensis* Cultivated Under Different Temperatures and Nitrogen Regimes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 1, p. 161-167, 2007.

COSTA, J.A.V.; COLLA, L.M.; DUARTE-FILHO, P.; KABLE, K., WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 603–607, 2002.

COSTA, J.A.V.; COLLA, L.M.; DUARTE, P.F. Improving *Spirulina platensis* biomass yield a fed-batch process. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 237–241, 2004.

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

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.

HENRARD, A. S. A. **Cultivo semicontínuo das microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp.** Rio Grande: FURG, 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, 2009.

KUMAR, A.; SHUKLA, R.; SINGH, P.; DUBEY, N. K. Chemical composition, antifungal and antiaflatoxic activities of *Ocimum sanctum* L. essential oil and its safety assessment as plant based antimicrobial. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 539–543, 2010.

LI, H.B.; CHENG, K. W.; WONG, C.C.; FAN, K.W.; CHEN, F.; JIANG, Y. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. **Food Chemistry**, v. 102, p. 771–776, 2007.

LIMA, V. L. A. G.; MELO, E. A.; MACIEL, M. A. S.; SILVA, B. S. G.; LIMA, D. E. S.; Fenólicos totais e atividade antioxidante do extrato aquoso de broto de feijão-mungo (*Vignaradiata*L.). **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 1, p. 53-7, 2004.

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.

MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M.; ANDRADE, M. R., F.; TEIXIERA, G. G.; BRUSCH, L. R. F.; COSTA, J.A.V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. **Aquaculture**, v. 294, p. 60–64, 2009.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**, 2º ed., Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2003.

OOIJKAAS, L.P.; TRAMPER, J.; BUITELAAR, R.M. Biomass estimation of *Coniothyrium minutans* in solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 480-486, 1998.

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

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.

REICHERT, C. C., REINEHR, C. O., COSTA, J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, p. 23-28, 2006.

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

SOUZA, M. M.; RECARTE, V. M.; ROCHA, M.; CIPOLATTI, E. P.; BADIALE-FURLONG, E. Study on the extracting conditions of phenolic compounds from onion (*Allium cepa* L.). **Revista do Instituto Adolf Lutz**, v. 68, n. 2, p. 192-200, 2009.

SOUZA, M. M.; OLIVEIRA, M. S.; ROCHA, M.; FURLONG, E. B. Antifungal activity evaluation in phenolic extracts from onion, rice bran, and *Chlorella pyrenoidosa* **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**, v. 35, n. 6, p. 1050-1058, 2011.

TANTAWY, S. T.A. Biological potential of cyanobacterial metabolites against some soil pathogenic fungi. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 9, n. 1, p. 663-666, 2011.

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.

ARTIGO 3

**Avaliação da atividade antifúngica de extrato fenólico de *Spirulina platensis*
contra *Aspergillus flavus***

Michele Moraes de Souza, Luciana Prietto, Anelise Christ Ribeiro, Taiana Denardi de Souza, Eliana Badiale-Furlong

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do extrato fenólico de *Spirulina platensis* na produção de componentes estruturais em culturas de *Aspergillus flavus*, a fim de identificar seu mecanismo de ação sobre a multiplicação fúngica. O extrato metanólico de *Spirulina platensis*, 1,15 mg compostos fenólicos/g *Spirulina platensis*, mostrou um efeito antifúngico contra *Aspergillus flavus*, demonstrado pela inibição da produção de glicosamina em até 56%. Desta forma, pode ser empregado como antifúngico natural para inibir a infecção de alimentos por *Aspergillus flavus*.

Palavras-chave: Inibidores fenólicos, propriedades antifúngicas, glicosamina, proteína, ergosterol

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of phenolic extract of *Spirulina platensis* in the production of structural components in cultures of *Aspergillus flavus*, in order to identify its action mechanism on fungal multiplication. The *Spirulina platensis* methanol extracts 1.15 mg phenols/ g *Spirulina platensis*, showed an antifungal effect against *Aspergillus flavus*, demonstrated by inhibiting the production of glucosamine by up to 56%. Thus, it can be used as a natural antifungal to inhibit infection by *Aspergillus flavus* in foods.

Keywords: Phenolic inhibitors, antifungal property, glucosamine, protein, ergostero

1. INTRODUÇÃO

Nas condições de aplicação os princípios ativos de fungicidas, apresentam baixo potencial de inibição da infecção fúngica funcionando muitas vezes como uma fonte de poluição química através dos seus resíduos tóxicos em frutas, legumes e no próprio ambiente (TANTAWY, 2011). Além disso, o uso prolongado de alguns fungicidas promoveram a resistência de muitos patógenos de plantas contribuindo ainda mais para a ineficácia deles e acelerando a demanda por tecnologias e alternativas para evitar a contaminação fúngica (BELEWA et al., 2011).

Em vários tecidos vegetais e microbianos estão presentes compostos químicos que atuam como defensivos naturais e entre esses estão incluídos compostos fenólicos, alcalóides, terpenos e proteínas e no caso de culturas microbianas, antibióticos (HARUTA et al., 2001, HOLMES et al., 2008; OLIVEIRA & BADIALE-FURLONG, 2008; AHMADI et al., 2010; SOUZA et al., 2010; SOUZA et al., 2011). Os compostos fenólicos podem se difundir através da membrana microbiana e penetrar dentro da célula, onde podem interferir com mecanismos metabólicos, tais como: dificultar a síntese de ergosterol, glucanas, quitina, proteínas e glicosamina em fungos, por exemplo (BRUL & KLIS, 1999; MARINO et al., 2001).

Para a extração dos compostos fenólicos vêm sendo usadas soluções aquosas, alcoólicas, aceto-etílicas e hexânicas sob diferentes condições de interação entre solventes exatratadores e matriz. O conhecimento da presença destes compostos em um determinado tipo de tecido e de seu mecanismo de atuação, além da contribuição científica pode ser subsídio para desenvolvimento de tecnologias que permitam o emprego destas substâncias para fins de produção de insumos alimentícios e medicamentos.

A cianobacteria *Spirulina* (Arthrospira) é utilizada como alimento pelo homem devido sua composição química, que apresenta elevada qualidade e quantidade protéica, aminoácidos essenciais, minerais, ácidos graxos poliinsaturados e vitaminas. Além disso, possui compostos fenólicos (ácidos caféico, clorogênico, salicílico, sináptico e trans-cinâmico), tocoferol e pigmentos como carotenóides, ficocianina e clorofila, entre seus compostos com alegação de efeito funcional (COLLA et al., 2009). No entanto, pouco se tem avaliado sobre a ação destes componentes no desenvolvimento de outros micro-organismos, em especial os fungos. Dentre eles, um que tem desafiado as tecnologias de controle, esta o *Aspergillus flavus*, que contamina grãos e seus derivados e que sob condições aleatórias pode manifestar potencial

toxigênico produzindo aflatoxina B1 e outras do metabolismo intermediário desta família de toxinas.

Para avaliar o efeito de compostos diversos sobre o desenvolvimento fúngico podem ser usados indicativos metabólicos de produção de biomassa tais como o ergosterol e a glicosamina. O primeiro é um lipídio constituinte das membranas celulares e pode funcionar como um marcador do Reino Fungi, visto que só nele é produzido (GESSNER & CHAUVET, 1993; BEHALOVÁ et al., 1994). A glicosamina é a unidade monomérica de um polímero de carboidrato constituinte da parede da célula fúngica, a quitina (DESGRANGES et al., 1991; TOMASELLI-SCOTTI et al., 2001).

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito do extrato fenólico de *Spirulina platensis*, na produção de componentes estruturais em *Aspergillus flavus* para estimar sua atividade antifúngica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 *Spirulina platensis* e preparação dos extratos fenólicos

Foi utilizada a cepa da cianobactéria *Spirulina* isolada da Lagoa Mangueira, situada na região sul do Rio Grande do Sul, e a água da Lagoa Mangueira foi suplementada com 20% (v/v) meio Zarrouk (Costa et al., 2004), referido como MLW-S médio foi empregada para manutenção do inóculo e produção da biomassa. A planta piloto para produção de *Spirulina* está localizado próxima da costa da Lagoa Mangueira (33 ° 30 '13 "S, 53 ° 08' 59" W) e consiste de tanques de diferentes dimensões e volumes em função da sua finalidade. Para este experimento foi utilizado um tanque de inóculo, (4,0 m de comprimento x 1,0 m de largura x 0,50 m de altura) com uma superfície de 3,87 m² e um volume de trabalho de 1000 L e três tanques de produção (13,0 m comprimento x 3,0 m largura x 0,50 m altura), cada um com uma superfície de 37,10 m² e um volume de trabalho de 10.000 L. Todos os tanques foram revestidos com fibra de vidro e cobertos por uma estrutura de filme de polietileno transparente para simular efeito estufa. Todas as culturas do tanque foram agitadas por uma roda de pás girando a 18 rpm 24 h por dia. O volume de meios de cultura foi mantida pela adição periódica de MLW para compensar a evaporação, cerca de 12 L/dia, para o tanque de 10.000 L, adicionados ao longo do experimento (MORAIS et al., 2009).

Para a extração dos compostos fenólicos foram utilizados 2 g de *Spirulina platensis* homogeneizados com 10 mL de metanol em agitador horizontal a 25 °C por

60 min a 100 rpm. A agitação foi interrompida durante 15 min, após a adição de mais 10 mL de metanol a agitação foi retomada por mais 60 min. O extrato foi filtrado e lavado com 20 mL de hexano, sendo o procedimento repetido 3 vezes. O extrato clarificado foi evaporado em evaporador rotatório a 50 °C e a massa foi ressuspensa em 25 mL de água destilada, e clarificado com 5 mL de hidróxido de bário 0,1M e 5 mL de sulfato de zinco 5%.

Os compostos fenólicos (CF) do extrato foram determinados por espectrofotometria usando o reagente de Folin-Ciocalteu estimados a partir de uma curva de padrão de ácido gálico cujas concentrações variaram de 2 to 30 µg/mL (SOUZA et al., 2009). Os valores dos CF das amostras foram expressos como mg de fenóis/g de amostras.

2.2 Micro-organismo

O micro-organismo que foi utilizado neste estudo foi o fungo patogênico *Aspergillus flavus* CCT 1217 adquirido da Coleção de culturas da Fundação André Tosello. A cultura foi mantida em ágar batata dextrose (PDA) a 24 °C por 12 dias até completa esporulação.

A solução de esporos foi obtida com solução de Tween 80 0,2%, filtração e contagem de esporos em câmara de Neubauer. A solução de esporos foi padronizada para 4×10^6 esporos/mL.

2.3 Efeito *in vitro* dos extratos fenólicos no desenvolvimento fúngico

A inibição do micro-organismo na presença dos CF foi estudada em meio BDA. O extrato fenólico da *Spirulina platensis* foi diluído diretamente no meio autoclavado após o resfriamento, e vertido em placas de Petri (9 cm de diâmetro). Estes procedimentos foram realizados sob condições assépticas (capela de fluxo laminar). A solução de esporos (42 µL) contendo 4×10^6 esporos/mL foi adicionada ao centro das placas. A incubação ocorreu em câmara de crescimento, a 24 °C por 21 dias (Oliveira et al., 2010).

O desenvolvimento do fungo foi estimado no 3°, 5°, 7°, 10°, 14° e 21° dias, tendo como referência o grupo controle (sem extrato fenólico). A porcentagem de inibição fúngica (NGUEFACK et al, 2004) foi calculada de acordo com a fórmula descrita na Equação 1:

$$I = 100 \times \frac{(C - T)}{C} \quad (1)$$

Onde:

I = porcentagem de inibição fúngica

C = teor de componente de fungos no meio controle

T= teor de componente do fungo contendo o inibidor.

O crescimento da biomassa fúngica, foi interrompido por congelamento a -18°C nos intervalos escolhidos. Foram determinados como indicativos de crescimento a massa seca do micélio, ergosterol, glicosamina e a proteína empregando a Equação 1 para estimativa da inibição.

2.4 Determinação da biomassa seca do micélio

O micélio foi separado do meio de cultura por filtração a vácuo e a quente e a massa seca foi determinada em estufa a 70°C até peso constante. Para cada medida foram realizadas três repetições.

2.5 Determinação da glicosamina

Os teores de glicosamina da biomassa foram avaliados pela adição de 5 mL de HCl 6M a 0,2 g de biomassa seca seguido por autoclavagem a 121°C por 8 min. A mistura foi resfriada, filtrada e avolumada em balão volumétrico de 5 mL com água destilada. Um mL do sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 25 mL, e uma gota de solução alcoólica de fenoltaleína (0,5% m/v) foi adicionado, seguido por neutralização com solução de NaOH 3M. A titulação reversa foi realizada com KHSO_4 1% (p/v) até o desaparecimento da cor rosa. O volume do balão foi completado com água destilada e dela 1 mL foi transferido para tubos de ensaio, ao qual foram acrescentados 1 mL de acetil acetona, a mistura foi então diluída em 50 mL de Na_2CO_3 0,5 M, seguido de aquecimento em água fervente por 20 min. Após o resfriamento, 6 mL de etanol e 1 mL de reagente de Erlich (2.67 g DAB - p-dimetilaminobenzaldeído dissolvido em 15 mL de etanol e 15 mL de ácido clorídrico) foram adicionados. Os tubos foram incubados em estufa a 65°C por 10 min. A absorvância foi lida em espectrofotômetro a 530 nm e o conteúdo de glicosamina foi estimado com uma curva padrão variando de 1 a 25 $\mu\text{g/mL}$. A recuperação do método foi determinada em níveis de fortificação, que variaram de 1 a 3 mg de glicosamina por grama de peso seco (AIDDO et al., 1981).

2.6 Determinação do conteúdo de ergosterol

O método modificado de Gutarowska e Zakowska (2009) foi utilizado para determinar o teor de ergosterol na biomassa seca e consistiu em agitar 0,2 g das amostras com 10 mL de metanol em agitador horizontal a 200 rpm por 30 min, repetindo-se três vezes a extração. O extrato metanólico total foi centrifugado a 3200 g a 20 °C por 10 min, 20 mL de KOH/metanol foram adicionados ao sobrenadante, que foi então aquecido sob refluxo, durante 30 min e resfriado a 4 °C. O material refluxado foi submetido a quatro partições com 20 mL de hexano. A fração hexano foi seco em evaporador rotativo a 60 °C. O resíduo foi dissolvido em 10 mL de metanol e a absorvância foi determinada a 283 nm.

O conteúdo de ergosterol foi estimado usando uma curva padrão de ergosterol cujas concentrações variaram entre 1,5-16,5 µg/mL. O conteúdo de ergosterol foi expresso em mg/g de biomassa seca.

2.7 Determinação de proteínas

Os níveis de proteína na biomassa fúngica foram estimados pelo método micro-Kjeldahl (AOAC, 2000), utilizando 6,25 como fator de conversão de nitrogênio total em proteína produzida pela biomassa.

2.8 Análise estatística

Os resultados obtidos pelos testes de atividade antifúngica foram avaliados comparando as médias de desenvolvimento fúngico ao longo do tempo na ausência e presença de CF usando o teste de Tukey. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversos tipos de solventes são comumente utilizados na extração de compostos fenólicos de matrizes vegetais e microbianas: água, acetato de etila, metanol, etanol, acetona e hexano. Em geral hexano remove interferentes como carotenoides e clorofila, metanol extrai açúcares, ácidos orgânicos e fenóis de baixo peso molecular e acetato de etila só extrai os fenóis de baixo peso molecular (MOURE et al., 2001; ROBARDS, 2003; SKERGET et al., 2005; RANIA et al., 2008; TANTAWY, 2011).

Neste trabalho, baseado em estudos anteriores, foi adotada a extração metanólica e posterior quantificação dos compostos fenólicos totais (SOUZA et al.,

2009). O conteúdo determinado foi de $1,15 \pm 0,13$ mg CFT/g *Spirulina platensis*, sendo a recuperação do sistema solvente adotado, superior a 85%. A extração de compostos fenólicos com hexano e acetato de etila. Nesta amostra mostrou baixos teores de compostos reativos com reagente de Folin-Ciocalteu, $0,37 \pm 0,07$ e $0,31 \pm 0,09$ mg CFT/g *Spirulina platensis* respectivamente, comparado com o extrato metanólico. Possivelmente nestas frações, os CF de baixo peso molecular como a formononetina e pinocembrina foram muito baixos em comparação com os presentes na fração metanólica, onde estão os ácidos orgânicos como o cafeico, o clorogênico, salicílico, sináptico e trans-cinâmico com maior potencial antioxidante (COLLA et al., 2007).

A microalga *Spirulina platensis* mostrou-se promissora como fonte de CFT comparativamente a outros tecidos mencionados pela literatura, como banana 0,31 mg CFT/g, batata 1 mg CFT/g, arroz polido 0,06-0,08 mg CFT/g (ZHOU et al., 2004), bagaço de laranja 0,69 mg CFT/g e polpa de berinjela 0,35 mg CFT/g (OLIVEIRA et al., 2007), bem como de outras microalgas como *Cryptocodinium cohnii* 0,36 mg/g e 0,37 mg/g, a *Nostoc ellipsosporum* 0,08 mg/g e 0,40 mg/g, a *Schizochytrium sp.* 0,12 mg/g e 0,16 mg/g e *Thraustochytrium sp.* 0,01 mg/g e 0,26 mg/g todos na fração hexano e acetato de etila, respectivamente (HUA-BIN et al., 2007).

Os CFT extraídos da *Spirulina platensis* foram testados quanto ao seu potencial de inibir biomassa de *Aspergillus flavus*, tendo como indicadores os teores de glicosamina, ergosterol e proteína, visando identificar o efeito dos extratos nos diferentes componentes das estruturas fúngicas e na própria quantidade de biomassa.

O potencial antifúngico dos CFT da microalga *Spirulina platensis* foi testado em diferentes concentrações destes no meio de cultura a fim de determinar a menor concentração inibitória, sendo este valor correspondente a 54 μ g de CFT/mL de meio de cultura. Colla et al. (2009) encontraram uma concentração inibitória mínima dos extratos fenólicos da *Spirulina platensis* para inibir a bactéria *S. aureus* da ordem de 47,5 mg/mL. Extratos metanólicos obtidos a partir de poejo (*Mentha pulegium L.*), taioba (*Xanthosema violaceum*) e jambolão (*Syzygium cuminii L.*) demonstraram que estas plantas necessitam, respectivamente, de 200, 50 e 60 mg/mL de extrato para inibir o *S. aureus*, no teste de difusão em ágar (MICHELIN et al., 2005). Na literatura somente há relatos de inibição dos compostos fenólicos de microalgas contra o crescimento de bactérias o que dificulta a comparação dos resultados obtidos em relação aos efeitos dos compostos fenólicos da *Spirulina platensis* no desenvolvimento fúngico.

Os níveis de biomassa fúngica seca produzida durante os experimentos controle e na presença de CF extraído da *Spirulina platensis* estão apresentadas na Tabela 1. As velocidades de desenvolvimento são mostrados na Figura 1.

Tabela 1 – Biomassa fúngica (gramas) *Aspergillus flavus* durante os experimentos.

Extrato	Dias					
	3 ^o	5 ^o	7 ^o	10 ^o	14 ^o	21 ^o
Controle	0,10 ^{a,A}	0,30 ^{b,C}	0,70 ^{c,D}	0,72 ^{c,D}	0,86 ^{d,F}	0,91 ^{d,F}
Tratamento	0,01 ^{a,B}	0,07 ^{b,A}	0,12 ^{c,A}	0,43 ^{d,E}	0,44 ^{d,G}	0,52 ^{d,H}

Letras minúsculas na mesma linha não diferem estatisticamente do controle ($p < 0,05$) para cada biomassa.

Letras maiúsculas na mesma coluna não diferem estatisticamente do controle ($p < 0,05$) para cada dia.

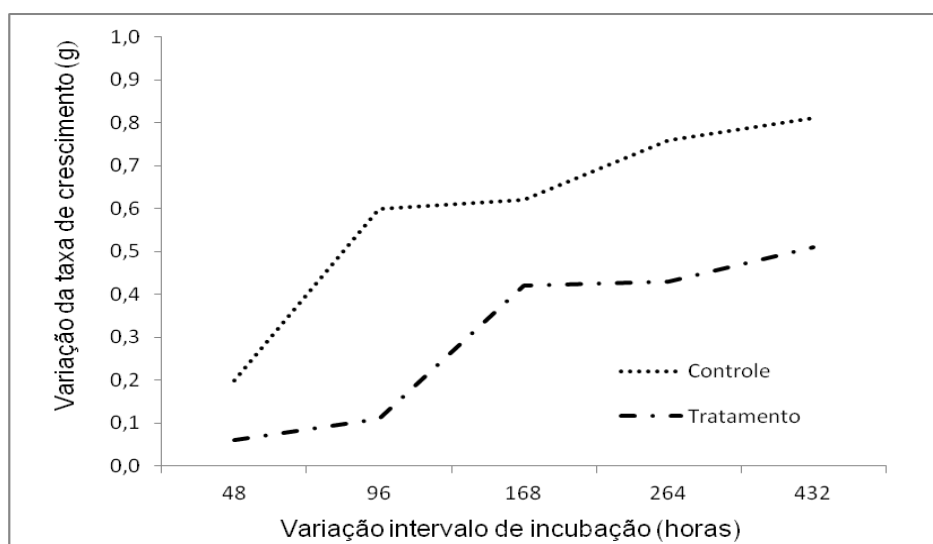


Figura 1: Variação da taxa de crescimento da biomassa de *Aspergillus flavus* na ausência e na presença dos CFT.

Em cada intervalo de experimento, a massa seca de *Aspergillus flavus* foi, em média, quatro vezes menor do que no experimento de controle, indicando que o crescimento de fungos foi inibido pela adição dos compostos fenólicos da *Spirulina platensis*. A Figura 1 mostra também a baixa taxa de crescimento da biomassa de *Aspergillus flavus* na presença dos CFT, com uma melhor correlação e linearidade do que a curva de controle no desenvolvimento da biomassa $R^2 = 0,861$ e $R^2 = 0,693$, respectivamente. SOUZA et al. (2010) testaram o crescimento de *Rhizopus oryzae* na presença de CFT de *Chlorella* sp., mas não houve inibição significativa por esta microalga.

Os níveis de glicosamina, proteínas e ergosterol do período estudado estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Componentes da biomassa fúngica durante os experimentos.

Período (dia)	Glicosamina (mg/g)		Ergosterol (mg/g)		Proteína (mg/g)	
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
3 ^o	nd	nd	nd	nd	nd	nd
5 ^o	21,2 ^{a,A}	9,3 ^{a,B}	3,0 ^{a,A}	2,2 ^{a,B}	244 ^{a,A}	156 ^{a,B}
7 ^o	23,9 ^{a,A}	17,1 ^{b,C}	3,1 ^{a,A}	2,4 ^{a,B}	217 ^{b,C}	151 ^{a,D}
10 ^o	24,1 ^{a,A}	17,8 ^{b,C}	2,8 ^{b,B}	2,2 ^{a,B}	221 ^{b,C}	195 ^{b,E}
14 ^o	27,2 ^{b,D}	19 ^{b,E}	3,0 ^{a,C}	2,4 ^{a,B}	283 ^{c,F}	237 ^{c,G}
21 ^o	32 ^{c,F}	22 ^{c,G}	2,8 ^{b,C}	2,4 ^{a,B}	291 ^{d,H}	301 ^{d,H}

Letras minúsculas na mesma linha não diferem estatisticamente do controle ($p < 0,05$) para cada componente celular.

Letras maiúsculas na mesma coluna não diferem estatisticamente do controle ($p < 0,05$) para cada componente celular.

No 3^o dia do experimento não foi possível medir a glicosamina, proteína e ergosterol, porque a biomassa fúngica não foi suficiente para satisfazer a exigência do limite de detecção do método. Posteriormente, os valores médios de glicosamina, ergosterol e teor de proteínas na presença dos CFT foram 1,6; 1,2 e 1,3 vezes respectivamente, inferiores aos do grupo controle, respectivamente, durante o experimento de 21 dias.

Estes valores representam uma inibição da glicosamina, significativa ao nível de 95% de confiança. O aumento do nível de glicosamina no grupo controle foi semelhante ao obtido por Desgranges et al. (1991), no cultivo de *Beauveria bassiana*, por Gelmi et al. (2000), em cultivo *Gibberella fujikuroi* e por Nopharatana et al. (2003), em cultivo de *Rhizopus oligosporus*. No entanto, foi diferente do aumento encontrado no caso de *Thermoascus aurantiacus*, em que o conteúdo de glicosamina permaneceu constante durante o período do estudo.

Nagel et al. (2001) utilizaram a glicosamina como indicador de crescimento de *Aspergillus oryzae* em grãos de trigo, estabelecendo uma equação empírica gerada pela relação da produção de glicosamina pela biomassa cultivada em um meio convencional. Eles verificaram que o teor de glicosamina aumentou de forma similar aos resultados encontrados neste estudo com *Aspergillus flavus*. Ooijkaas et al. (1998) também verificaram um aumento no teor de glicosamina de *Coniothyrium minitans* cultivado em placas de Petri, ao longo do tempo de cultivo. É importante ressaltar que

a quantificação de glicosamina também é o mais comum para avaliar a produção de biomassa fúngica em fermentação em estado sólido.

De acordo com Cowan (1999), a atividade antimicrobiana de substâncias fenólicas pode estar ligada a sua capacidade de tornar a camada de proteína bacteriana extracelular mais complexa, porém não há relato sobre este aspecto específico com relação aos fungos. No entanto, o mesmo indicador de inibição da parede celular foi observada neste estudo com a tendência verificada em relação ao conteúdo proteico (Figura 2).

Em presença de extratos fenólicos de *Spirulina platensis*, não houve inibição significativa (95% de confiança) no conteúdo de ergosterol produzido durante o experimento. Fato que sugere que o ergosterol pode não ser um bom indicador para monitorar o desenvolvimento da biomassa de *Aspergillus flavus*, pois manteve-se relativamente constante no controle e na cultura com CFT, indicando que eles não afetaram os componentes da membrana, como foi mencionado por Behalová et al. (1994), Barajas-Aceves et al. (2002) e Gutarowska & Zakowska (2009). A Figura 2 mostra a porcentagem de inibição do *Aspergillus flavus* pelo extrato fenólico de *Spirulina platensis* em cada componente em estudo.

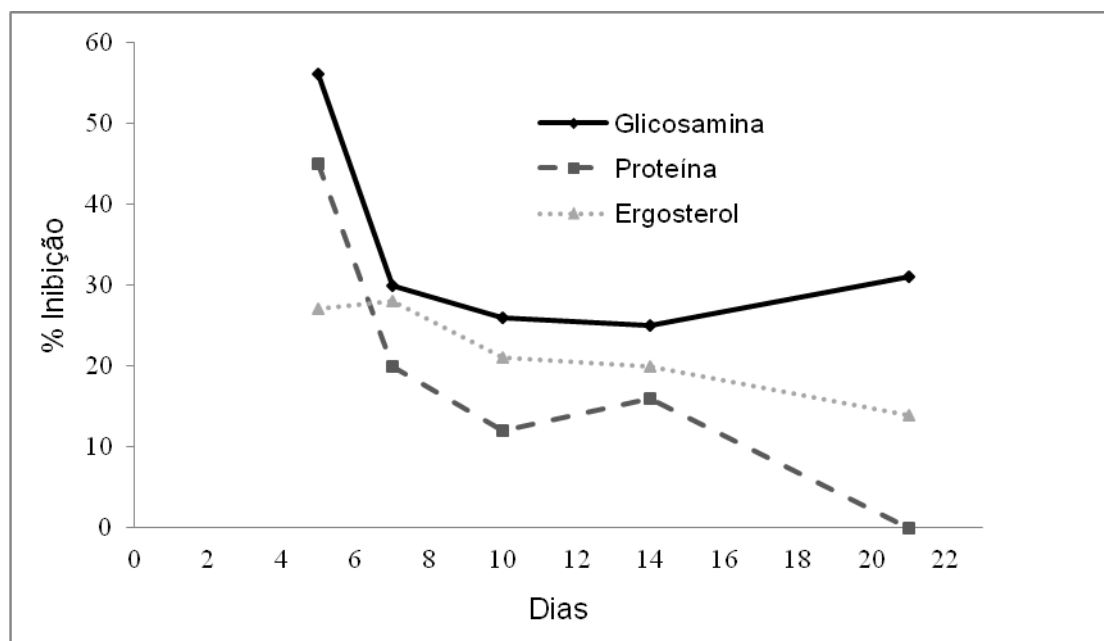


Figura 2: Inibição fungica pelo extrato de *Spirulina platensis*.

A presença de CFT no meio de cultura não afetou a produção de proteína durante o período de incubação. Deve ser salientado que a porcentagem de inibição de glicosamina foi, em média, duas vezes maior do que a de ergosterol e a de proteína.

Mesmo que o teor de proteínas na biomassa fúngica tenha sido afetado pelo extrato fenólico, não foi o componente mais representativo do desenvolvimento do fungo, pois teve um padrão instável de produção ao longo do tempo, mesmo sendo estimado usando o fator de 6,25, o que não é específico para a espécie fúngica. Ele foi adotado pela convenção, visto não estar disponível um fator específico. No entanto, isto não invalida a verificação da evolução da produção de proteínas ao longo do cultivo.

Kaushik & Chauhan (2008) relataram que extratos de *Spirulina platensis* inibiram o desenvolvimento de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, e *K. pneumoniae*. Os autores utilizaram hexano, acetato de etila, diclorometano e metanol para a obtenção dos extratos fenólicos sendo que os extratos metanólicos tiveram os melhores resultados. O extrato metanólico contra o crescimento de *S. aureus* e *E. coli* obtiveram uma concentração mínima inibitória de (CMI) 128 µg/mL e 256 µg/mL, respectivamente. Parisi et al. (2009) também constataram uma alta atividade antimicrobiana dos compostos fenólicos extraídos com metanol a partir de *Spirulina platensis* contra *S. aureus*. No entanto, não há relatos sobre testes antifúngicos usando compostos fenólicos extraídos de *Spirulina platensis*, embora os resultados, sobre a inibição, de uma espécie toxigênica, como o aqui relatado, tenham sido promissores em termos de impedir o desenvolvimento da parede celular do *Aspergillus flavus*.

4. CONCLUSÃO

O conteúdo de glicosamina na biomassa fúngica é o mais adequado para investigar o efeito de extratos de *Spirulina platensis* no desenvolvimento de biomassa fúngica de *Aspergillus flavus* pois sua produção foi linear ao longo do tempo no experimento controle e dentre os componentes testados foi o mais afetado pelos fenóis no meio de cultura. O extrato fenólico de *Spirulina platensis* mostrou atividade antifúngica, inibindo a produção de glicosamina em até 56% para este micro-organismo.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMADI, F.; SADEGHI, S.; MODERRESI, M.; ABIRI, R.; MIKAELI, A. Chemical composition, in vitro anti-microbial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanolic extract of *Hymenocrater longiflorus* of Iran. **Food and Chemistry and Toxicology**, v. 48, p. 1137-1144, 2010.

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

BARAJAS-ACEVES, M.; HASSAN, M.; TINOCO, R.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Effect of pollutants on the ergosterol content as indicator of fungal biomass. **Journal of Microbiological Methods**, v. 50, p. 227-236, 2002.

BEHALOVÁ, B.; BLÁHOVA, M.; BEHAL, V. Regulation of sterolbiosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Microbiology**, v. 39, p. 287-290, 1994.

BELEWA, V.; BAIJNATH, H.; SOMAI, B.M. Aqueous extracts from the bulbs of *Tulbaghia violacea* are antifungal against *Aspergillus flavus*. **Journal of Food Safety**, v. 31, n. 2, p. 176-184, 2011.

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

COLLA, L. M.; BADIALE-FURLONG, E.; COSTA, J.A.V. Antioxidant Properties of *Spirulina (Arthospira) platensis* Cultivated Under Different Temperatures and Nitrogen Regimes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 1, p. 161-167, 2007.

COSTA, J.A.V.; COLLA, L.M.; DUARTE-FILHO, P.; KABLE, K., WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 603–607, 2002.

COSTA, J.A.V.; COLLA, L.M.; DUARTE, P.F. Improving *Spirulina platensis* biomass yield a fed-batch process. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 237–241, 2004.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, p. 564-582, 1999.

DESGRANGES, C.; VERGOLNAN, C.; GEORGES, M.; DURAND, A. Biomass Estimation in Solid State Fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 200-205, 1991.

- DISCH, A.; SCHWENDER, J.; MULLER, C.; LICHTENTHALER, H. K.; ROHMER, M. Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714. **Biochemistry**, v. 30, p. 427-433, 1998.
- GELMI C.; PÉREZ-CORREA, R.; GONZÁLEZ, A.; AGOSIN, E. Solid Substrate Cultivation of *Gibberella fujikuroi* on an Inert Support. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1227-1233, 2000.
- GESSNER, M.O.; E. CHAUVET, E. Ergosterol-to-biomass conversion factors for aquatic hyphomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 502-507, 1993.
- 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.
- HARUTA, M.; MAJOR, I.T.; CHRISTOPHER, M.E.; PATTON, J.J.; CONSTABEL, C.P. A Kunitz trypsin inhibitor gene family from trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.): cloning, functional expression, and induction by wounding and herbivory. **Plant Molecular Biology**, v. 46, p. 347-359, 2001.
- HOLMES, R.A.; BOSTON, R.S.; PAYNE, G.A. Diverse inhibitors of aflatoxin biosynthesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, p. 559–572, 2008.
- HUA-BIN, L.; KA-WING, C.; CHI-CHUN, W.; KING-WAI, F.; FENG, C.; YUE, J. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. **Food Chemistry**, v. 102, p. 771–776, 2007.
- IKASARI, L.; MITCHELL, D.A. Two-Phase Model of the Kinetics of Growth of *Rhizopus oligosporus* in Membrane Culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, p. 619-627, 2000.
- KAUSHIK, P.; CHAUHAN, A. In vitro antibacterial activity of laboratory grown culture of *Spirulina platensis*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 48, p. 348-52, 2008.
- 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 & Technology**, v. 67, p. 187-195, 2001.

MICHELIN, D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; PAGANELLI, M. O.; CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 316-20, 2005.

MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M.; ANDRADE, M. R., F.; TEIXIERA, G. G.; BRUSCH, L. R. F.; COSTA, J.A.V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. **Aquaculture**, v. 294, p. 60–64, 2009.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMINGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H.; NUNEZ, M. J.; PARAJO, J. C. Natural antioxidants from residual sources (Review). **Food Chemistry**, v. 72, p. 145-171, 2001.

NAGEL, F. J. I.; TRAMPER, J.; BAKKER, M. S. N.; RINZEMA, A. Temperature Control in a Continuously Mixed Bioreactor for Solid-State Fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, p. 219-230, 2001.

NGUEFACK, J.; LETH, V.; ZOLLO, A.; MATHUER, 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**, v. 94, p. 329-334, 2004.

NOPHARATANA, M.; MITCHELL, D. A.; HOWES, T. Use of Confocal Microscopy to Follow the Development of Penetrative Hyphae During Growth of *Rhizopus oligosporus* in an Artificial Solid-State Fermentation System. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 81, p. 438-447, 2003.

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

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

OLIVEIRA, I.; SOUSA, A.; FERREIRA, C. F. R.; BENTO, A.; ESTEVINHO, L.; PEREIRA, J. A. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2326–2331, 2008.

OOIJKAAS, L. P.; TRAMPER, J.; BUITELAAR, R. M. Biomass Estimation of *Coniothyrium minutans* in Solid-State Fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 480-486, 1998.

PEELER, T. C.; STEPHENSON, M. B.; EINSPAHR, K. J.; TOMPSON, G. A. Lipid Characterization of an enriched plasma membrane fraction of *Dunaliella salina* Grown in media of varying salinity. **Plant physiology**, v. 89, p. 970-976, 1989.

ROBARDS, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables (Review). **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 657-691, 2003.

SKERGET, M.; KOTNIK, P.; HADOLIN, M.; HRAS, A. R.; SIMONIC, M.; KNEZ, Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 89, p. 191-198, 2005.

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

SOUZA, M. M.; OLIVEIRA, M. S.; ROCHA, M.; FURLONG, E. B. Antifungal activity evaluation in phenolic extracts from onion, rice bran, and *Chlorella phyrenoidosa* **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 680-685, 2010.

SOUZA, M. M.; RECARTE, V. M.; ROCHA, M.; CIPOLATTI, E. P.; BADIÁLE-FURLONG, E. Study on the extracting conditions of phenolic compounds from onion (*Allium cepa* L.). **Revista do Instituto Adolf Lutz**, v. 68, n. 2, p. 192-200, 2009.

SPARRINGA, R.A.; OWENS, J.D. Glucosamine content of tempe mould, *Rhizopus oligosporus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, p. 153-157, 1999.

TANTAWY, S. T.A. Biological potential of cyanobacterial metabolites against some soil pathogenic fungi. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 9, n. 1, p. 663-666, 2011.

TOMASELLI-SCOTTI, C.; VERGOIGNAN, C.; FERON, G.; DURAND, A. Glucosamine Measurement as Indirect Method for Biomass Estimation of *Cunninghamella elegans* Grown in Solid State Cultivation Conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 7, p. 1-5, 2001.

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

ARTIGO 4

Atividade antioxidante *in vitro* de extratos fenólicos das microalgas *Spirulina platensis* e *Chlorella* sp.

Michele Moraes de Souza, Luciana Prietto, Anelise Christ Ribeiro, Taiana Denardi de Souza, Eliana Badiale-Furlong

RESUMO

Conduziu-se este trabalho, com a proposta de avaliar o conteúdo e o potencial de compostos fenólicos extraídos de duas microalgas, *Spirulina platensis* e *Chlorella* sp., utilizando modelos *in vitro*. Foram determinados o teor de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu utilizando curva de calibração de ácido gálico. A avaliação *in vitro* do potencial antioxidante foi investigada pelos métodos de captação do radical DPPH, pela inibição do escurecimento enzimático ocasionado pela enzima peroxidase e pela peroxidação lipídica do azeite de oliva. A *Spirulina platensis* apresentou maior conteúdo de compostos fenólicos ($1,1 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{massa seca}}$) em comparação com a *Chlorella* sp. ($0,65 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{massa seca}}$) além de uma maior capacidade sequestrante de radicais livres, inativou 53,5% do DPPH reativo em 120 minutos (CE_{50} de $70 \mu\text{g}_{\text{ácido gálico}}/\text{mL}$). Este mesmo extrato limitou o escurecimento enzimático ocasionado pela peroxidase em 55% e inibiu a peroxidação lipídica em 46% após 14 dias de armazenamento.

Palavras-chave: Fenóis, DPPH, microalgas, peroxidação lipídica, inibição do escurecimento enzimático.

ABSTRACT

This work was carried out with the purpose of evaluating the content and antioxidant potential of phenolic compounds extracted from two microalgae: *Spirulina platensis* and *Chlorella* sp. using *in vitro* models. It was determined the total phenolic content by Folin-Ciocalteu method using the gallic acid calibration curve. The *in vitro* antioxidant potential evaluation was investigated by the DPPH radical scavenging methods, enzymatic browning caused by peroxidase inhibition and the olive oil lipid peroxidation. *Spirulina platensis* showed the highest phenolic content (1.1 mg_{GAE} /g_{dry mass}) compared to *Chlorella* sp. (0.65 mg_{GAE} /g_{mass dry}) and a higher capacity for scavenging free radicals, the DPPH reagent was inactivated until 53% in 180 minutes (EC₅₀ of 70 mg_{gallic acid} /mL). The same extract limited enzymatic browning caused by peroxidase in 55% and inhibited lipid peroxidation by 46% after storage during 14 days.

Keywords: Phenols, DPPH, microalgae, lipid peroxidation, inhibition of peroxidase browning.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de microalgas na alimentação humana ocorre há séculos, sendo usadas como fonte de proteínas por tribos indígenas como os Astecas, que as secavam em camadas finas para serem consumidas. Quando cultivadas em meios adequados, certas espécies de microalgas podem duplicar a sua biomassa diariamente, alcançando produtividades de 30 a 50 g/m²dia em massa seca. Esta característica, aliada a simplicidade nas técnicas de cultivo, torna as microalgas um dos objetos de pesquisa prioritários há três décadas (DERNER et al., 2006).

As microalgas também são potenciais alimentos funcionais, pois sua atividade fotossintética intensa propicia a produção de estruturas químicas com atividade biológica diferenciada (PINERO ESTRADA et al., 2001; HERRERO et al., 2005; COLLA et al., 2007; HAJIMAHMOODI et al., 2010).

Os estudos sobre compostos bioativos extraídos de microalgas têm enfatizado e demonstrado a sua atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antifúngica, citotóxica e propriedades de inibição enzimática, entre outras (COLLA et al., 2007; HAJIMAHMOODI et al., 2010; SOUZA et al., 2011). Estas propriedades tornaram as microalgas alvo de usos terapêuticos para cura ou prevenção de doenças crônicas tais como diabetes, hipertensão, hipercolesterolemia e outras (BELAY, 2002). As que mais se destacam para fins diversos são as *Spirulina platensis* e a *Chlorella*, sendo classificadas como seguras para o consumo humano GRAS, do inglês (Generally Recognized As Safe) emitido pelo FDA (Food and Drug Administration).

A maioria dos efeitos benéficos dos componentes das microalgas são resultantes de sua atividade antioxidante. Assim, para estudar estas propriedades vários ensaios foram propostos. Eles diferem em relação ao mecanismo de reação, adotado em ensaios químicos, e as espécies alvo dos ensaios biológicos. Não obstante a diversidade de métodos para avaliar a capacidade antioxidante, não existe um procedimento metodológico universal. Este fato impõe a necessidade de avaliar a capacidade antioxidante por diferentes ensaios, com fundamentos e mecanismos de ação diferentes para uma mesma fonte.

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, que absorve radiação em um comprimento de onda de 515 nm. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R), o DPPH é reduzido formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H), de coloração amarela, com consequente

desaparecimento da banda de absorção, sendo a mesma monitorada pelo decréscimo da absorvância. A partir dos resultados obtidos, determina-se a porcentagem de atividade antioxidante (quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante) ou sequestradora de radicais e/ou a porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE_{50}), também chamada de concentração inibitória (CI_{50}). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE_{50} e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA et al., 2007; MORAIS et al., 2009).

A atividade antioxidante também pode se manifestar na inibição dos efeitos de oxidorreduções 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 (OLIVEIRA et al., 2007).

Poucos estudos são realizados para se avaliar o efeito inibidor de compostos fenólicos em sistemas enzimáticos, particularmente com respeito à peroxidase. 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. 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 de diferentes fontes, que têm sido apontados como responsáveis pela propriedade antioxidante (COLLA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007).

Também são usados os ensaios que utilizam lipídios como substrato, determinando o índice de peróxidos para avaliar a evolução do processo oxidativo de um óleo. A quantificação dos peróxidos gerados tem como base duas de suas propriedades, liberar iodo da solução de iodeto de potássio ou oxidar íons Fe^{2+} a Fe^{3+} . O índice de peróxido é geralmente expresso em termos de miliequivalentes de peróxidos por quilograma do óleo (meq/kg).

Neste trabalho, as microalgas *Spirulina platensis* e *Chlorella* sp. foram investigadas quanto a possibilidade de serem utilizadas como fontes de antioxidantes naturais, mais especificamente os compostos fenólicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Solventes, reagentes e soluções

Todos os solventes e reagentes usados foram de grau analítico. O reagente Folin-Ciocalteu foi adquirido da Merck, Brasil. O radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), 95% de pureza e o padrão de ácido gálico foram adquiridos da Sigma Aldrich. Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico.

2.2 Microalgas

A cianobactéria *Spirulina platensis* foi fornecida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) e armazenada em recipientes plásticos sob refrigeração, até o momento da extração dos compostos fenólicos. A *Spirulina platensis* foi isolada da Lagoa Mangueira e cultivada em uma planta piloto localizada perto da costa dessa lagoa, constituída por três tanques, revestidos com fibra e agitados por pás, no interior de uma estufa de filme de polietileno transparente. A cultura da microalga foi adicionada aos tanques em quantidade suficiente para uma produção inicial de 10.000 L em cada tanque. As culturas foram mantidas no tanque sob luz natural por 387 dias. A biomassa de *Spirulina platensis* foi coletada dos tanques, seca em estufa e triturada em moinho de facas (COSTA et al., 2002; 2004; MORAIS et al., 2009).

A microalga utilizada *Chlorella* sp., foi fornecida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG, mantida e cultivada em meio BG-11, contendo a seguinte composição em (g/L): NaNO₃ (1,50); K₂HPO₄.3H₂O (0,04); MgSO₄.7H₂O (0,075); CaCl₂.2H₂O (0,036); citrato férrico (0,006); EDTA (0,001); Na₂CO₃ (0,02); Acido Cítrico (0,006) e micronutrientes (HENRARD, 2009).

Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores abertos tipo *raceway* de 6 L com 5 L de volume útil e concentração celular inicial 0,20 g/L. A agitação dos cultivos foi realizada através de bombas submersas com vazão de 60 L/h fixadas nos fotobiorreatores. A iluminância foi de 3200 Lux possuindo como fonte, lâmpadas fluorescentes tipo luz do dia (40 Watts). O aparato experimental foi mantido durante 40 dias em câmara termostatizada não estéril a 30 °C, com fotoperíodo de 12 h claro/escuro (REICHERT et al., 2006).

2.3 Caracterização físico-química das microalgas

O pH e a acidez titulável das microalgas foram determinados segundo procedimentos da AOAC (2000). O material microbiano foi homogeneizado em água

previamente fervida na proporção de 1:9; sob agitação por 30 minutos. No sobrenadante foram determinados os pHs potenciométricamente, utilizando um pHmetro marca Hanna modelo 200. A acidez titulável foi determinada por titulometria de neutralização com NaOH 0,1 mol/L e expressa em porcentagem de acidez total.

Os teores de umidade foram determinados empregando o método gravimétrico de secagem em estufa com circulação de ar a 105 °C, segundo o método nº 935.29 da Association of Official Analytical Chemists – AOAC (2000). As cinzas foram determinadas por método gravimétrico através de incineração das amostras em mufla 550 °C, método nº 923.03 da AOAC (2000). A determinação de lipídios foi realizada pela extração com éter de petróleo de acordo com o método nº 920.85 da AOAC (2000), e os níveis proteicos foram determinados pelo método de micro-kjeldahl nº 920.87, empregando como fator de conversão de nitrogênio o valor geral de 6,25 para as microalgas (AOAC, 2000). Os carboidratos das microalgas *Spirulina platensis* e *Chlorella sp.* foram determinados por diferença.

2.4 Extração dos compostos fenólicos

Para extração dos compostos fenólicos, 8 g de microalga foram homogeneizadas com 10 mL de metanol em agitador orbital a temperatura ambiente por 60 min a 200 rpm para a microalga *Chlorella sp.* e 100 rpm para a *Spirulina platensis*. A agitação foi interrompida durante 15 min, após, foram adicionados mais 10 mL de metanol e agitados por 60 min. O filtrado foi lavado com 20 mL de hexano. O extrato foi clarificado (para eliminação de interferentes) com 5 mL de hidróxido de bário 0,1 mol/L e 5 mL de sulfato de zinco 5%.

A quantificação dos compostos fenólicos das microalgas nos extratos foi realizada por espectrofotometria utilizando o reagente Folin-Ciocalteu. Alíquotas de 0,5 e 0,8 mL dos extratos foram adicionados em uma série de tubos, completando o volume para 1 mL com água destilada. Em seguida, foram adicionados 4,5 mL de solução alcalina (Na₂CO₃ 2%, CuSO₄ 2% e tartarato duplo de sódio e potássio 4%, nas proporções 100:1:1). A mistura permaneceu em repouso por 15 min em banho-maria a 37 °C. Foram adicionados 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (diluído 1:2 com água destilada) seguido de repouso por mais 15 min a temperatura de 37°C. A leitura das unidades de absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro (VARIAN/CARY 100) a 750 nm. Os compostos fenólicos totais foram quantificados com auxílio de uma curva de calibração de ácido gálico cujas concentrações variaram de 2-30 µg/mL (SOUZA et al., 2011). Os valores dos compostos fenólicos nas amostras foram

expressos em μg de equivalente de ácido gálico ($_{\text{GAE}}$) / g microalga, apresentadas como média \pm desvio padrão. As determinações foram realizadas em triplicata. O coeficiente de determinação da curva analítica foi de 0,9987 e a equação da curva foi $Y = 0,0307 x$ ($\mu\text{g/mL}$), sendo a variável do eixo x a concentração e do eixo y a absorvância.

2.5 Determinação da atividade antioxidante (ensaio *in vitro*)

2.5.1 Atividade de sequestro do radical DPPH

A atividade antioxidante dos extratos fenólicos das microalgas foi medida utilizando procedimento descrito por Herrero et al. (2005) com modificações, monitorando-se o consumo do radical livre DPPH pela amostra, através da determinação do decréscimo da unidade de absorvância (uA) nas soluções contendo os extratos fenólicos. As medidas foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis (VARIAN/CARY-100) em comprimento de onda 515 nm, utilizando como controle positivo o ácido gálico. Aos tubos contendo 3,0 mL da solução metanólica de DPPH ($5,2 \times 10^{-5}$ mol/L) foram adicionados 0,5 mL de metanol e 0,5 mL dos extratos fenólicos. A mistura reativa permaneceu a temperatura ambiente, sem a incidência de luz e a mudança de cor violeta para amarela foi medida após 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min de reação. A solução de DPPH foi preparada diariamente e estocada em frascos âmbar cobertos com folhas de alumínio, mantidas no escuro a 4 °C até o momento das determinações.

A curva de calibração do DPPH (diluído em metanol) foi preparada a partir de uma solução estoque metanólica na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, do qual foram diluídas a 40, 35, 30, 25, 15, 10, 5 e 1 $\mu\text{g/mL}$.

A capacidade de sequestrar radical livre foi expressa como percentual de inibição de oxidação do radical e calculado conforme equação abaixo.

$$\% \text{ Inibição} = ((A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Extr}}) / A_{\text{DPPH}}) * 100 \quad (1)$$

Onde A_{DPPH} é a absorvância da solução de DPPH e A_{Extr} é a absorvância da amostra em solução. A_{Extr} foi calculada com base na diferença entre a absorvância da solução de amostra em teste com o seu branco. O valor de IC_{50} foi definido como a concentração final em $\mu\text{g/mL}$ do extrato presente na cubeta, requerido para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%, conforme Roesler et al. (2007).

2.5.2 Inibição da oxidação catalisada enzimaticamente

A peroxidase empregada foi extraída de batata rosa (*Solanum tuberosum*). O extrato enzimático foi obtido de 20 g de polpa de batata homogeneizada com 100 mL de solução tampão fosfato pH 6,5 (20 mM) sob agitação em blender por 3 min. O homogeneizado foi centrifugado a 3220 g a 4 °C, por 10 min, e filtrado. O extrato bruto (sobrenadante) foi mantido a aproximadamente 4 °C, para posterior utilização como fonte de peroxidase (OLIVEIRA et al., 2007).

A reação enzimática de escurecimento foi realizada a 30 °C em pH 6,5 utilizando-se o guaiacol 1% como substrato em presença de H₂O₂ 0,08%. Os extratos fenólicos foram adicionados como inibidores da reação (1 mL de extrato fenólico) e no grupo controle o volume de extrato fenólico foi substituído por água destilada. Ao grupo controle foram adicionados 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% e 1 mL de extrato enzimático. A absorvância foi medida a 470 nm em um espectrofotômetro VARIAN modelo CARY 100 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%).

2.5.3 Inibição da peroxidação lipídica

Foram preparados 4 conjuntos de reatores, sendo cada conjunto formado por 10 erlenmeyeres de 125 mL, cada par correspondente a um tempo de armazenamento 0, 7, 14, 21 e 30 dias. Em todos os erlenmeyeres foram pesados 5 g de óleo de oliva com precisão analítica (0,0000g). Ao primeiro conjunto (Branco) foram adicionados 500 µL de solução metanólica (correspondente à maior concentração do metanol do extrato fenólico). Ao segundo conjunto (Padrão) foram adicionados 500 µL de uma solução de ácido gálico contendo 100 µg/mL. Ao terceiro conjunto foram adicionados 350 µL de extrato fenólico de *Spirulina platensis* com 100 µg GAE/mL e 500 µL de extrato fenólico de *Chlorella* sp.. contendo 94 µg GAE/mL. Aos quarto conjunto de experimento foram adicionados, respectivamente, 500 µL de extrato fenólico de *Spirulina platensis* com 150 µg GAE/mL e 700 µL de extrato fenólico de *Chlorella* sp.. contendo 143 µg GAE/mL. Após a adição dos reagentes os frascos foram homogeneizados a 200 rpm em agitador horizontal durante 30 min. Antes da implantação do experimento foram determinados os índices de peróxidos de 2 reatores de cada tratamento (tempo zero), segundo o método descrito por OLIVEIRA (2009). Os demais reatores foram mantidos em câmara termostatizada a 25 °C com

iluminância de 3000 lux fornecida por lâmpadas fluorescentes (Philips, TL 40W, luz do dia) em fotoperíodo fixado de 12 h claro/12 h escuro. A cada 7 dias, foram determinados os índices de peróxido de 2 reatores de cada tratamento até completar 30 dias.

O conteúdo de peróxido do óleo de oliva foi extraído de 5 g de amostra com 30 mL de uma solução de clorofórmio-ácido acético (3:1) sob agitação horizontal durante 1 min. Em seguida foram acrescentados 30 mL de água destilada previamente fervida e 1 mL da solução de KI saturada. A mistura ficou em repouso no escuro durante 15 min sendo em seguida titulada com solução de tiosulfato de sódio 0,014 M empregando solução de amido gelatinizado (0,5%) como indicador (0,5 mL). A determinação foi realizada em duplicata e a média de volumes gastos na titulação foi empregada para a estimativa do índice de peróxido expresso como meq_{peróxido}/kg_{amostra}. O índice de peróxidos foi calculado através da Equação 2.

$$IP = \frac{(V - V_b) \times N}{m} \times 1000 \quad (2)$$

Sendo: IP = índice de peróxidos.

V = volume (mL) de solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação do óleo com o extrato.

V_b = volume (mL) de solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco.

N = normalidade padronizada do tiosulfato de sódio.

m = massa de óleo (kg)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados das médias ± desvio padrão dos elementos de composição centesimal das microalgas *Spirulina platensis* e *Chlorella* sp., ou seja, umidade, carboidratos, cinzas, proteínas e lipídios. A acidez titulável e o pH foram respectivamente 0,3% e 5,7 para a *Spirulina platensis* e 0,1% e 5,5 para a *Chlorella* sp.

Tabela 1: Composição proximal das microalgas.

Composição	<i>Spirulina platensis</i>	<i>Chlorella</i> sp.
Umidade (%)	6,8±0,4 ^a	8,9±1,0 ^b
Cinzas (%)	6,7±0,1 ^a	5,4±0,5 ^a
Proteínas (%)	53,8±1,3 ^a	51,0±2,3 ^a
Carboidratos (%)	28,8±0,6 ^a	28,6±1,0 ^a
Lipídios (%)	3,9±1,4 ^a	6,1±0,8 ^b

Cada valor foi obtido por meio da média \pm desvio padrão de triplicatas.

*Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa nas médias pelo teste de Tukey ($\alpha < 0,05$).

A composição proximal determinada para as microalgas foi semelhante a encontrada por outros autores, levando-se em conta as diferenças decorrentes do tipo de cultivo e de outras variáveis abióticas (HENRIKSON, 1994; COLLA et al., 2007; SOUZA et al., 2010). Os dados obtidos permitem afirmar que as microalgas estudadas são basicamente constituídas por proteínas e carboidratos.

Os resultados encontrados foram de 1,1 e 0,65 mg GAE/g massa seca_(ms) para os extratos metanólicos de *Spirulina platensis* e de *Chlorella* sp., respectivamente. Estes foram dados inferiores aos relatados por Colla et al. (2007) que encontrou valores de até 4,9 mg GAE/g massa seca para a *Spirulina platensis*, este fato pode ter ocorrido devido as condições de cultivo, que foram específicas para produção de compostos fenólicos.

Li et al. (2007) estudaram o conteúdo de fenóis totais e a atividade antioxidante em $\mu\text{mol Trolox/g}$ das microalgas *Chlorella protothecoides*, *Chlorella pyrenoidosa* e *Chlorella vulgaris* em três sistemas de solventes (hexano, acetato de etila e água), encontrando valores de conteúdo fenólico variando de 0,97 a 2,67 (mg GAE/g) para os extratos aquosos; 1,6 a 8,12 (mg GAE/g) para extratos aceto-etilícos e de 3,12 a 14,35 (mg GAE/g) para os extratos hexânicos. Os resultados neste trabalho para a *Chlorella* sp. também foram inferiores aos mencionados pelos autores que utilizaram solventes e condições de cultivo distintas.

Cabe salientar que os valores de CFT na *Spirulina platensis* e *Chlorella* sp. foram superiores aos encontrados por Hajimahmoodi et al. (2010), que obtiveram para a *Chlorella vulgaris* valores da ordem de 0,02 a 0,49 (mg GAE/g) para a fração hexânica, 0,02 a 3,59 (mg GAE/g) para a fração aceto-etílica e 3,69 a 19,14 (mg GAE/g) para a fração aquosa. Fato que também demonstra que o conteúdo de compostos fenólicos é fortemente dependente do tipo de solvente extrator.

A capacidade de sequestrar radicais livres em relação ao radical estável 2,2-difenil-1-picril hidrazila (DPPH) foi inicialmente escolhida por se tratar de um procedimento simples, rápido e sensível a pequenas variações no potencial sequestrante (SOUSA et al., 2007).

A atividade antioxidante dos extratos fenólicos determinados pela inativação do DPPH esta apresentada na Tabela 2.

Tabela 2: Concentração de fenóis totais dos extratos das microalgas e a % de DPPH consumido.

Microalga	$\mu\text{g}_{\text{fenóis}}/\text{mL}_{\text{extrato}}$	DPPH consumido (%)						
		0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
<i>S. platensis</i>	48,6	4,0±0,6 ^a	17,1±0,1 ^b	19,2±0,1 ^c	22,8±0,2 ^e	23,0±0,0 ^e	22,0±0,6 ^e	22,3±0,2 ^e
<i>S. platensis</i>	73,0	6,8±1,4 ^a	29,4±0,9 ^b	38,0±0,3 ^c	42,6±0,5 ^d	52,0±1,0 ^e	52,0±0,8 ^e	53,5±1,2 ^e
<i>Chlorella</i> sp.	29,2	1,3±0,01 ^a	8,4±0,8 ^b	11,0±1,2 ^c	11,4±0,8 ^c	13,0±1,0 ^c	11,2±0,2 ^c	12,0±0,8 ^c
<i>Chlorella</i> sp.	41,1	2,1±0,25 ^a	11,1±1,1 ^b	14,3±1,6 ^c	13,0±0,9 ^{b,c}	13,4±0,6 ^{b,c}	15,1±1,2 ^c	14,3±0,6 ^c

Os valores estão expressos como média \pm SD (n=3).

Letras sobrescritas iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

Os resultados mostraram que o extrato fenólico de *Spirulina platensis* (73 $\mu\text{g}_{\text{fenóis}}/\text{mL}_{\text{extrato}}$) apresentou a maior atividade antioxidante. Porém em todos os extratos e concentrações estudadas a atividade antioxidante foi estatisticamente igual no intervalo de tempo a partir de 90 min. Cabe salientar que as concentrações dos extratos foram diferentes em função da microalga *Chlorella* sp. possuir um menor conteúdo de compostos fenólicos, porém o volume de extrato adicionado para ambas microalgas foi o mesmo. Wu et al. (2005), já haviam verificado que o extrato de *Spirulina* apresentava maior atividade antioxidante do que outras algas comerciais, como a *Chlorella*, atribuindo este efeito ao maior conteúdo de compostos fenólicos naquela espécie.

Um extrato que apresenta alto potencial em sequestrar radicais livres possui baixo valor de IC_{50} . Os menores valores de IC_{50} foram obtidos quando o antioxidante era ácido gálico 4,3 $\mu\text{g/mL}$, e para o extrato de *Spirulina platensis* que foi de 140 $\mu\text{g/mL}$.

Mendiola et al. (2007) fizeram uma triagem de compostos com atividade antioxidante da *Spirulina platensis* em uma extração com fluido supercrítico, e encontraram valores de IC_{50} , estimado pela inibição do DPPH, de até 297 $\mu\text{g/mL}$, comparados aos 4,4 $\mu\text{g/mL}$ para o ácido ascórbico e de 14,4 $\mu\text{g/mL}$ para o BHT (antioxidante sintético). Roesler et al. (2007) estudaram resíduos de vegetais e encontraram valores de IC_{50} inferiores aos encontrados nas microalgas, para o extrato etanólico e aquoso de casca de pequi (9,44 e 17,98 mg/mL respectivamente), extrato etanólico de semente e casca de araticum (30,97 e 49,18 mg/mL , respectivamente). O IC_{50} para o extrato comercial de alecrim foi de 80,84 mg/mL , sendo que estes apresentavam em média 2 vezes mais compostos fenólicos que as microalgas estudadas.

A Figura 1 mostra o efeito inibitório dos extratos fenólicos das microalgas sobre a reação de escurecimento do guaiacol, em duas concentrações, catalisada pelo extrato enzimático da peroxidase extraída da batata.

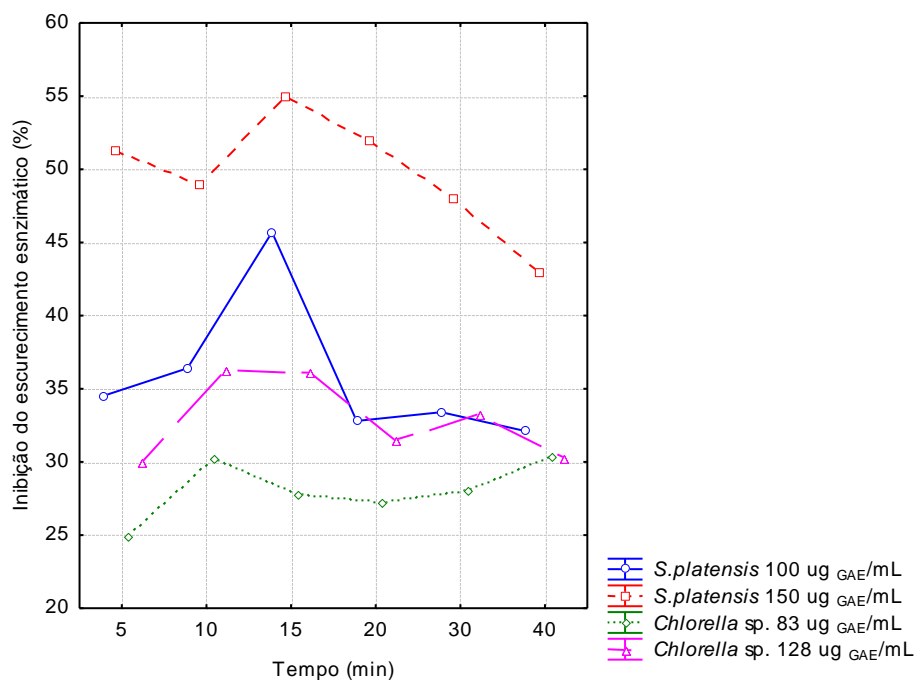


Figura 1: Inibição da reação de escurecimento enzimático pelos extratos das microalgas.

O extrato fenólico de *Spirulina platensis* na concentração de 150 µg GAE/mL extrato apresentou a maior inibição aos 15 minutos de reação, estimado em 55% de inibição do escurecimento enzimático catalisado por peroxidase extraída da batata, mas o escurecimento enzimático foi inibido pelos extratos de ambas as microalgas em todos os tempos estudados.

Colla et al. (2007) encontraram atividade de inibição da peroxidase extraída da batata, de no máximo 35%, quando a concentração de fenóis da *Spirulina platensis* foi de 4,9 mg fenóis/g de biomassa seca. Oliveira et al. (2007) verificaram que ocorria a inibição do escurecimento enzimático catalisado por peroxidase em presença de extratos fenólicos de cascas de limão, laranja e maçã, que inibiram 76% (108 µg fenóis/mL_{extrato}), 74,5% (73,3 µg fenóis/mL_{extrato}) e 82% (50 µg fenóis/mL_{extrato}), respectivamente.

Os resultados da inibição da peroxidação lipídica estimados em meq_{peróxido}/kg_{amostra} aparecem na Tabela 3.

Tabela 3: Índices de peróxido ($\text{meq}_{\text{peróxido}}/\text{kg}_{\text{amostra}}$) dos experimentos ao longo do armazenamento em presença ou não de extratos fenólicos.

Experimento (dias)	Controle	Padrão (ácido gálico)	Extrato S. <i>platensis</i> 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Extrato S. <i>platensis</i> 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Extrato <i>Chlorella</i> 94 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Extrato <i>Chlorella</i> 143 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Zero	4,1 \pm 0,2 ^a	4,1 \pm 0,1 ^a	4,2 \pm 0,1 ^a	4,1 \pm 0,0 ^a	4,3 \pm 0,2 ^a	4,1 \pm 0,1 ^a
7	6,0 \pm 0,5 ^{b,c}	4,6 \pm 0,3 ^a	5,4 \pm 0,1 ^{a,b,c}	5,0 \pm 0,4 ^a	5,8 \pm 0,0 ^{b,c}	5,3 \pm 0,3 ^{a,b,c}
14	18,2 \pm 1,3 ^d	8,7 \pm 0,9 ^a	13,1 \pm 2,1 ^{a,c}	9,9 \pm 0,3 ^b	15,0 \pm 0,9 ^{b,cd}	13,1 \pm 0,6 ^{b,c}
21	24,3 \pm 2,0 ^e	13,6 \pm 0,5 ^a	21,0 \pm 1,4 ^{c,d}	16,7 \pm 0,5 ^b	22,3 \pm 0,3 ^{d,e}	19,4 \pm 0,1 ^{b,c}
30	21,1 \pm 2,1 ^b	13,5 \pm 0,9 ^a	22,0 \pm 1,6 ^b	18,8 \pm 0,0 ^b	20,9 \pm 0,5 ^b	18,9 \pm 1,1 ^b

Os valores estão expressos como resultado de média \pm desvio padrão (n=3).

Letras sobrescritas iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

O tratamento com o padrão de ácido gálico (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi o que apresentou as maiores porcentagens de inibição da formação de peróxido, chegando a 52% no 14º dia de experimento. Com relação aos extratos de microalgas, o de *Spirulina platensis* (150 μg GAE/mL) foi o que apresentou maior inibição, reduzindo o conteúdo deste composto em 46% aos 14 dias e 31% aos 21 dias, significativamente, quando os índices de peróxidos são comparados com o controle. O extrato fenólico da microalga *Chlorella* sp. (143 μg GAE/mL) apresentou a sua maior inibição de 28% aos 14 dias de experimento. Após os 14 dias de experimento, todos os tratamentos tiveram poder de inibir a peroxidação lipídica. O efeito inibitório da peroxidação lipídica pode estar relacionado com a capacidade dos fenóis em seqüestrar radicais hidroxil, os iniciadores da peroxidação lipídica

Souza et al. (2006), estudaram a redução do índice de peróxido para o óleo de soja e para o azeite de oliva em presença e ausência do pigmento ficocianina extraído da *Spirulina platensis* e observaram, para o óleo de soja, no tempo de 8 horas de oxidação, valores de 7,84 $\text{meq}/\text{kg}_{\text{amostra}}$ para a concentração de 0,5% de ficocianina, 5,16 $\text{meq}/\text{kg}_{\text{amostra}}$ para a concentração de 1,0%, enquanto que para a concentração de 1,5% foi de 12,94 $\text{meq}/\text{kg}_{\text{amostra}}$. Quando o óleo de soja foi oxidado na ausência do antioxidante estudado, o índice de formação de peróxidos foi de 17,76 $\text{meq}/\text{kg}_{\text{amostra}}$. A redução no índice de peróxidos foi maior com a utilização do pigmento ficocianina na concentração de 1%, seguida da concentração de 0,5%. Para o azeite de oliva, o máximo índice de peróxido também foi observado em 8 horas, com valores de 6,24

meq/kg_{amostra} para a concentração de 0,5%, 7,13 meq/ kg_{amostra} para 1,0% e 11,81 meq/kg_{amostra} para a concentração de 1,5% e para o azeite de oliva oxidado na ausência de ficocianina, o índice de formação de peróxidos foi de 18,35 meq/ kg_{amostra}. O índice de peróxidos máximo foi maior no azeite de oliva adicionado de 0,5% de ficocianina, seguido das concentrações de 1,0% e 1,5%.

Oliveira (2009) estudou a inibição da peroxidação lipídica pela redução do índice de peróxido do azeite de oliva, empregando como antioxidante os extratos fenólicos de farelo de arroz fermentado com *Rhizopus oryzae* e encontrou inibição de 60% aos 21 dias de experimento, portanto mais eficientes que os extratos das microalgas.

Wang et al. (2007) estudaram a atividade antioxidante de extratos de *Spirulina platensis* em um ensaio utilizando o método de peroxidação lipídica de ácido linoleico, demonstrando que a atividade dos extratos de *Spirulina platensis* foi inferior comparativamente com a do BHT (Butil-hidroxitolueno) e Trolox, mas foi significativamente maior que a do α -tocoferol em 300 minutos. Segundo os autores, a atividade antioxidante dos extratos de *Spirulina platensis* e os antioxidantes de referência diminuíram na seguinte ordem: Trolox > BHT > extratos \geq α -tocoferol.

4. CONCLUSÕES

As microalgas *Spirulina platensis* e *Chlorella* sp. são fontes de compostos fenólicos com propriedades antioxidantes, sendo a primeira com o maior conteúdo de compostos fenólicos (1100 μ g GAE/g). A mesma também inibiu de forma mais eficiente o radical DPPH, o escurecimento enzimático e a peroxidação lipídica.

A microalga *Chlorella* sp. também apresentou atividade antioxidante frente a todos os métodos estudados, porém com valores inferiores aos apresentados pelo extrato fenólico de *Spirulina platensis*, que se apresentou mais promissora para utilização de seus compostos antioxidantes naturais.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BELAY, A. The potential application of *Spirulina (Arthrospira)* as a nutritional and therapeutic supplement in health management. **Journal of the American Nutraceutical Association**, v. 5, n. 2, p. 27-48, 2002.

- COLLA, L. M., BADIALE-FURLONG, E. COSTA, J.A.V. Antioxidant properties of *Spirulina (Arthrospira) platensis* cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 1, p. 161-167, 2007.
- COSTA, J.A.V.; et al. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.18, p.603–607, 2002.
- COSTA, J.A.V.; COLLA, L.M.; DUARTE, P.F. Improving *Spirulina platensis* biomass yield a fed-batch process. **Bioresource Technology**, v. 92, p.237–241, 2004.
- DERNER, R, B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas Produtos e Aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, 2006.
- HAJIMAHMOODI, M., FARAMARZI, M. A., MOHAMMADI, N., SOLTANI, N., OVEISI, M. R., NAFISSI-VARCHEH, N. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. **Journal Applied Phycology**, v. 22, p.43–50, 2010.
- HENRARD, A. S. A. **Cultivo semicontínuo das microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp.** Rio Grande: FURG, 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, 2009.
- HENRIKSON, R. **Microalga *Spirulina* – Superalimento del futuro.** Barcelona. Ediciones S.A. Urano, ISBN 84-7953-047-2, 1994.
- 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.
- LI, H.B.; CHENG, K. W.; WONG, C.C.; FAN, K.W.; CHEN, F.; JIANG, Y. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. **Food Chemistry**, v. 102, p. 771–776, 2007.
- MENDIOLA, J. A.; JAIME, L.; SANTOYO, S.; REGLERO, G.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E.; SEÑORANS, F. J. Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina platensis*. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1357–1367, 2007.
- MORAIS, S.A.L.; AQUINO, F.J.T.; NASCIMENTO, P. M.; NASCIMENTO, E.A.; CHANG, R. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café conilon submetido a diferentes graus de torra. **Química Nova**, v. 32, n.2, p. 327-331, 2009.

MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M.; ANDRADE, M. R.; TEIXEIRA, G. G.; BRUSCH, L.R.F.; COSTA, J. A. V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. **Aquaculture**, v.294, p. 60–64, 2009.

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

OLIVEIRA, M. S. **Disponibilização de compostos funcionais em farelo de arroz fermentado em estado sólido**. Rio Grande: FURG, 2009. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, 2009.

PINERO ESTRADA, J.E.; BERMEJO BESCÓS, P.; VILLAR DEL FRESNO, A.M. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **Farmaco**, v. 56, p. 497-500, 2001.

REICHERT, C. C., REINEHR, C. O., COSTA, J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, p. 23-28, 2006.

ROESLER, R.; MALTA, L. G. CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n.1, p. 53-60, 2007.

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

SOUZA, F.T.; MARGARITES, A.C.; COLLA, L.M.; COSTA, J.A.V., BERTOLIN, T.E. Evaluation of the antioxidant potential of phycocyanin in soil and olive oils. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, n. 3 p. 275-279, 2006.

SOUZA, M. M.; et al. Antifungal activity evaluation in phenolic extracts from onion, rice bran, and *Chlorella pyrenoidosa* **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**, v. 35, n. 6, p. 1050-1058, 2011.

WANG, L.; PAN, B.; SHENG, J.; XU, J.; HU, Q. Antioxidant activity of *Spirulina platensis* extracts by supercritical carbon dioxide extraction. **Food Chemistry**, v. 105, p. 36–41, 2007.

WU, L.C.; HO, J.A.A.; SHIEH, M.C.; LU IN, W. Antioxidant and antiproliferative activities of *Spirulina* and *Chlorella* extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4207-4212, 2005.

ARTIGO 5

Atividade antiaflatoxina de compostos fenólicos naturais da *Spirulina platensis*

Michele Moraes de Souza, Eliana Badiale-Furlong

RESUMO

O estudo trata da eficácia do extrato fenólico de *Spirulina platensis* contra o *Aspergillus flavus* e a produção de aflatoxina. O extrato fenólico de *Spirulina platensis* teve quantificado os seus componentes individuais, empregando CLAE-UV, sendo que o ácido gálico representou 49,5% e o ácido cafeico 43,3%. O extrato na concentração de $78 \mu\text{g}_{\text{fenóis}}/\text{mL}_{\text{extrato}}$ inibiu em até 80% o desenvolvimento do *Aspergillus flavus* impedindo a produção de aflatoxina B₁ até o 10º dia de incubação. As conclusões do estudo apontam para a possível exploração de conservantes seguros da *Spirulina platensis* contra a contaminação de alimentos por *Aspergillus flavus*.

Palavras-Chave: Aflatoxinas, antifúngico, *Aspergillus flavus*, conservador de alimentos, extrato fenólico, *Spirulina platensis*

ABSTRACT

The study addresses the effectiveness of phenol-water extract of *Spirulina platensis* and its main component, gallic acid, against *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. The phenol-water extract of *Spirulina platensis* was quantified about its individual compounds, using HPLC-UV being the gallic acid 49.5% and the caffeic acid 43.3%. The extract at a concentration of $78 \mu\text{g}_{\text{phenolic}}/\text{mL}_{\text{extract}}$ inhibited by 80% the development of *Aspergillus flavus* and declined its aflatoxin B₁ production until the 10th day. The findings point to the possible exploitation of *Spirulina platensis* safe preservatives against food spoilage by *Aspergillus flavus*.

Keywords: Aflatoxins, antifungal, *Aspergillus flavus*, food preservatives, phenolic extract, *Spirulina platensis*.

1. INTRODUÇÃO

A contaminação fúngica é um problema sério durante a produção de alimentos. Algumas espécies representam um risco muito grave para os consumidores por causa da produção de metabólitos secundários que possuem efeito patogênico para humanos e animais de criação, sem que este dano seja aparente. Nesta classe está o *Aspergillus flavus*, produtor de aflatoxinas que possui propriedades cancerígenas, teratogênicas, hepatotóxicas e imunossupressoras (HEIDTMANN-BEMVENUTI et al, 2011; TIAN et al, 2012). Cerca de 4,5 bilhões de pessoas são afetadas pela ingestão de aflatoxinas, principalmente em países em desenvolvimento e a aflatoxicose ocupa a 6ª posição entre os 10 mais importantes riscos à saúde (WILLIAMS et al. 2004).

Segundo a FAO (Food and Agriculture Organization), estima-se que 25% das lavouras de alimentos do mundo são afetadas por micotoxinas e aproximadamente 10% dos produtos alimentícios agrícolas no mundo são severamente degradados por fungos. Uma vez que alimentos, produtos alimentícios e especiarias sejam contaminados por aflatoxinas é quase impossível detoxificar utilizando métodos normais de cozimento. Portanto, controlar o crescimento e a produção de aflatoxinas por espécies toxigênicas de *Aspergillus* usando aditivos alimentares e componentes naturais extraídos de plantas tem sido recomendado.

O uso de fungicidas sintéticos é uma tecnologia comum para proteger os alimentos da deterioração por fungos e contaminação por micotoxinas. No entanto, a maioria dos fungicidas sintéticos pode apresentar toxicidade residual nas colheitas e no ambiente, propiciando a seleção de espécies resistentes, além de efeitos crônicos adversos a saúde (SRIVASTAVA et al. 2008). Tais riscos tem resultado na busca por alternativas para substituir o uso de antifúngicos sintéticos (SOFOS et al 1998;. KILANI-JAZIRI et al 2011).

Nos últimos anos a demanda do consumidor por produtos naturais, eficazes e seguros, para controle de deterioração dos alimentos tem aumentado (SOUZA et al., 2011; TIAN et al., 2011; 2012). Óleos essenciais e produtos aromáticos voláteis do metabolismo secundário das plantas, formaram a base de muitas aplicações de aromatizantes na indústria de alimentos e conservação (RAHMAN & KANG, 2009; TIAN et al., 2012). Outros estudos vêm demonstrando a possibilidade de substituir conservantes químicos por naturais extraídos de fontes microbianas, como a cianobactéria *Spirulina platensis* (COLLA et al., 2007; ABEDIN & TAHA, 2008; KAUSHIK & CHAUHAN, 2008; TANTAWY, 2011; SOUZA et al., 2011). Esta microalga

como outras, são tidas como boas fontes de compostos fenólicos, principalmente os ácidos fenólicos, além de estarem associadas a uma série de efeitos benéficos a saúde promovidas pela presença destes compostos (COLLA et al., 2007; LI et al., 2007).

Os ácidos fenólicos, conhecidos como compostos bioativos, são amplamente encontrados em todo o reino vegetal e microbiano. A eles vem sendo atribuídas propriedades de atuarem como antioxidantes, antifúngicos, antimutagênicos, anticarcinogênicos, anti-inflamatórios, antimicrobianos, entre outras (XU et al., 2008). Para exercer tantas funções biológicas é bem possível que apareçam em misturas de estruturas com base semelhante, mas com distintos substituintes que podem atuar sinergisticamente.

Em vista disto, a cromatografia líquida de alta eficiência é a técnica mais adequada para separar, identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes em diferentes fontes. Por isto, neste estudo foi avaliado o perfil dos compostos fenólicos presentes em extratos metanólicos de *Spirulina platensis* bem como sua atividade sobre o crescimento micelial e a produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 *Spirulina platensis* e cultivo

A cianobactéria *Spirulina platensis* foi fornecida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) e armazenada em recipientes plásticos sob refrigeração, até o momento da extração dos compostos fenólicos. A microalga foi isolada da Lagoa Mangueira e cultivada em uma planta piloto localizada próximo a costa dessa lagoa, constituída por três tanques revestidos com fibras, agitados por pás, localizados no interior de uma estufa de filme de polietileno transparente. A cultura foi adicionada aos tanques de produção, em quantidade suficiente para uma produção inicial de 10.000 L em cada tanque. As culturas foram mantidas sob luz natural no tanque por 387 dias. A biomassa de *Spirulina platensis* foi retirada dos tanques, seca em estufa e triturada em moinho de facas (COSTA et al., 2002; 2004; MORAIS et al., 2009).

A amostra de *Spirulina platensis* foi analisada quanto à umidade conforme a metodologia descrita pelo AOAC (2000), que consiste na secagem direta em estufa com circulação de ar a 105 °C.

2.2 Extração de fenóis ácidos da *Spirulina platensis*

Foram pesadas 2 gramas de *Spirulina platensis* seca e adicionados 10 mL de metanol e agitados a temperatura ambiente em mesa agitadora orbital TE - 141 da marca TECNAL por 60 min a 200 rpm. A agitação foi interrompida por 15 min, em seguida, adicionado 10 mL de metanol, sendo a agitação foi realizada por mais 60 min. Os extratos foram filtrados e clarificados com 5 mL de hidróxido de bário 0,1M e 5 mL de sulfato de zinco 5%; as soluções foram filtradas e transferidas quantitativamente para um balão volumétrico de 25 mL, sendo o volume final completado com o solvente utilizado na extração, metanol (SOUZA et al., 2011). Os extratos foram centrifugados a 3220 g por 10 min para posterior injeção no CLAE.

A determinação quantitativa dos compostos fenólicos totais nos extratos foi realizada por espectrofotometria de UV/VIS utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, e o procedimento consistiu em tomar alíquotas de 500 µL do extrato, agitar com 500 µL de água destilada e 4,5 mL de Na₂CO₃ 4% por 1 min, colocando em banho-maria a 37 °C por 15 min. As misturas foram agitadas por 30 segundos em banho ultra-som com 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído 1:2 com água destilada. Após 10 min, foi medida a absorvância das soluções em comprimento de onda de 750 nm. O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorvância das amostras a partir de uma curva analítica construída com uma solução padrão de ácido gálico contendo 100 µg/mL, da qual foram preparadas diluições variando entre 2 e 30 µg/mL. Os resultados foram expressos como µg de equivalente de ácido gálico (GAE)/ g de *Spirulina platensis*.

2.3 Perfil de compostos fenólicos

Os padrões cromatográficos para a determinação de compostos fenólicos (ácido gálico, ácido cafeico, ácido trans-cinâmico e ácido salicílico) foram obtidos da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO) com 98-99% de pureza. O metanol grau cromatográfico e o ácido acético de grau analítico foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Foi utilizado um sistema Milli-Q da Millipore (Bedford, USA) para purificar a água utilizada para o preparo da fase móvel. Foi utilizada membrana filtrante com poros de 0,45 µm, da Millipore.

Os padrões de compostos fenólicos foram dissolvidos em metanol para obter soluções estoque 0,1 mg/mL, as quais foram armazenadas em frascos de vidro âmbar a 4 °C.

Para separação, identificação e quantificação cromatográfica dos compostos fenólicos do extrato de *Spirulina platensis*, foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência composto por bomba LC-AT, degaseificador DGU, controlador CBM-20A, detector SPD-20A, injetor manual 7725i com loop de 20 μ L, detector UV-Visível 10AXL e software LC Solution- Shimadzu (Figura 1).

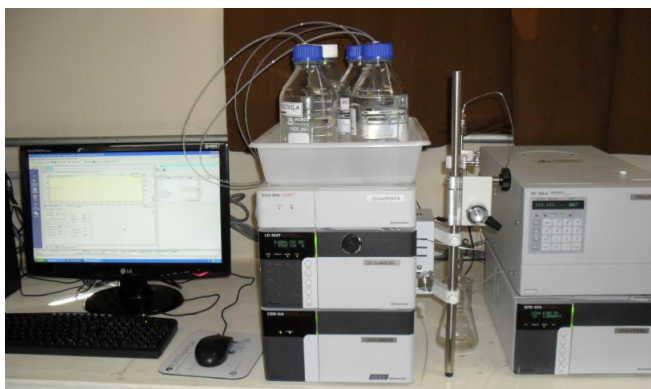


Figura 1: Cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado aos detectores de ultravioleta e fluorescência.

Os compostos fenólicos da *Spirulina platensis* foram separados empregando uma coluna de fase reversa RP-18 CLC-ODS octadecil nas dimensões de 5 μ m x 4,6 mm x 150 mm. A eluição foi realizada com fase móvel em gradiente de solução aquosa de ácido acético (99:1, v/v), metanol e acetonitrila que variou conforme o descrito na Tabela 1, com vazão de 1,0 mL/min, perfazendo um tempo total de corrida de 18 minutos. O volume injetado foi de 20 μ L.

Tabela 1: Programa do gradiente de eluição dos solventes para separação de compostos fenólicos em *Spirulina platensis*.

Intervalo de Tempo (minutos)	Solução aquosa de ácido acético (99:1) (%)	Acetonitrila (%)	Metanol (%)
1 - 3	65	3,5	31,5
3 - 10	57	4,3	38,7
10 - 12	41	5,9	53,1
12 - 18	65	3,5	31,5

Para identificar os compostos na mistura foi utilizada a comparação dos tempos de retenção e dos espectros dos picos separados com os padrões (DUTRA et al., 2010). O espectro de máxima absorção na região ultravioleta foi determinado pela injeção dos padrões isolados em três concentrações crescentes. O aumento do sinal gerado confirmou seus tempos de retenção (t_R).

Cada padrão estudado foi analisado individualmente, para obtenção dos seus tempos de retenção e das suas curvas determinadas no UV, e posteriormente foram reunidos para comporem a mistura de padrões empregada para a quantificação.

As curvas analíticas e linearidade da resposta do detector UV-Visível para os compostos fenólicos foram avaliados pela construção da curva analítica através da injeção de um total de cinco soluções padrão para os níveis de concentração entre 2,3 e 37 $\mu\text{g/mL}$ para o ácido gálico, de 11 a 176 $\mu\text{g/mL}$ para o ácido cafeico, 18,3 a 293 $\mu\text{g/mL}$ para o ácido salicílico e de 0,43 a 7 $\mu\text{g/mL}$ para o *trans*-cinâmico, com três injeções de cada concentração, preparadas a partir de soluções estoque de 100 $\mu\text{g/mL}$ para o ácido gálico e *trans*-cinâmico, 300 $\mu\text{g/mL}$ para o ácido cafeico e 500 $\mu\text{g/mL}$ para o ácido salicílico, sendo as diluições feitas em metanol. Os dados de regressão linear foram obtidos com auxílio do software do equipamento. A partir destes dados foi avaliado o coeficiente de correlação linear (r) do instrumento.

2.4 Ensaio de atividade antifúngica

O micro-organismo utilizado neste estudo foi o fungo patogênico *Aspergillus flavus* CCT 1217 adquirido da Coleção de Culturas da Fundação Tropical de Pesquisa André Tosello. A cultura foi mantida em ágar batata dextrose (BDA) a 24 °C por 12 dias até completa esporulação. A solução de esporos foi obtida com solução de tween 80 0,2%, filtração e enumeração de esporos em câmara de Neubauer padronizada para 4×10^6 esporos/mL.

A atividade antifúngica foi determinada *in vitro* pelo método bioanalítico que consistiu em acompanhar o desenvolvimento do micro-organismo em placas contendo meio BDA em presença e ausência do extrato fenólico de *Spirulina platensis*. O meio de cultura foi preparado com os cuidados assépticos usuais em cultivo microbiano. O extrato fenólico metanólico da *Spirulina platensis* foi evaporado em evaporador rotatório a 60 °C para ser diluído diretamente no meio autoclavado, e vertido em placas de Petri (9 cm de diâmetro). Em cada placa foram adicionados os extratos fenólicos nas concentrações do estudo (26 µg/mL; 52 µg/mL e 78 µg/mL) definidas em testes anteriores, sempre observando as condições assépticas (Câmara de Fluxo Laminar LABCONCO modelo 36210, tipo B2). Nas placas controle, os extratos foram substituídos pela mesma quantidade de água estéril, adicionada antes do meio de cultura. Após a solidificação, foram adicionados ao centro das placas a solução de esporos (42 µL) seguindo-se a incubação em câmara de crescimento, a 24 °C por 21 dias (OLIVEIRA & BADIALE-FURLONG, 2008; SOUZA et al., 2010).

A inibição percentual do crescimento radial da cepa testada pelo extrato em comparação com o controle, foi calculada usando a seguinte fórmula, no 3°, 5°, 7°, 10°, 14° e 21° dias de incubação, calculada de acordo com a equação 1.

$$\text{Porcentagem de inibição do micélio} = [(dc - dt)/dc] \times 100 \quad (1)$$

Onde dc (cm) é o diâmetro das colônias para os conjuntos do grupo controle e dt (cm) é o diâmetro das colônias para os conjuntos do grupo tratamento. O MIC (concentração mínima inibitória) foi definido como a concentração que inibiu pelo menos em 50% o desenvolvimento das colônias de *Aspergillus flavus*. As determinações foram realizadas em triplicata para cada condição em estudo (TIAN et al., 2012).

As placas de Petri contendo concentração de 78 µg fenóis/mL extrato (concentração necessária para inibir 50% do crescimento micelial do *Aspergillus*

flavus) após os intervalos de incubação mencionados anteriormente, foram congeladas para posterior determinação das aflatoxinas. O controle foi definido como o tratamento sem o extrato. Três repetições de cada tratamento foram realizadas (TIAN et al., 2012).

2.5 Determinação de aflatoxinas

As soluções estoque de micotoxinas (Tabela 2) foram preparadas conforme metodologia descrita por Scott (1990). Cada padrão de micotoxina contendo aproximadamente 5 mg foi dissolvido em 100 mL de benzeno:acetonitrila (95:5). As soluções estoque foram diluídas de modo a resultar em soluções padrão cujas concentrações foram confirmadas espectrofotometricamente considerando a absorvidade molar.

As soluções trabalho foram armazenadas a -18 °C e no momento do uso foram secas sob atmosfera de nitrogênio, ressuspensas em metanol e homogeneizadas em banho ultrassônico.

Tabela 2: Descrição das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ utilizadas.

Micotoxina	Fornecedor	Grau de pureza (%)	Peso molecular (g/mol)	$\lambda_{\text{emissão}}$ (nm)	$\lambda_{\text{excitação}}$ (nm)	Absortividade molar
Aflatoxina B ₁	Sigma Aldrich	≥ 98	312,27	425	360	21800
Aflatoxina B ₂	Sigma Aldrich	≥ 98	314,29	425	362	24000
Aflatoxina G ₁	Sigma Aldrich	≥ 98	328,27	455	362	17700
Aflatoxina G ₂	Sigma Aldrich	≥ 98	330,29	455	362	19300

Foi utilizada uma coluna Supelco Bio Wide Pore 10 μm C18 (25 cm x 4,6 mm). O eluente foi estabelecido em estudos preliminares, sendo constituído por mistura de água acidificada (99:1), metanol e acetonitrila na proporção de 60:28:12 (v/v/v) previamente desgaseificados por agitação em banho ultra-sônico por 30 min. Em seguida, a coluna foi condicionada pela passagem da fase móvel durante 30 min a uma vazão de 1,0 mL/min a temperatura ambiente. A identificação das aflatoxinas nas

amostras foi realizada com base em seus tempos de retenção em comparação com as soluções padrões das aflatoxinas.

Cada padrão de aflatoxina estudada foi analisado por CLAE-FL individualmente, determinação de seus tempos de retenção e das suas curvas de fluorescência. Posteriormente, foram reunidos para compor a mistura de padrões para as determinações quali e quantitativas.

As curvas analíticas e a linearidade da resposta do detector para as aflatoxinas foram avaliadas pela injeção de seis soluções padrão nas concentrações de 8, 16, 24, 32, 40, 56 e 80 ng/mL para a B₁; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,4 e 2 ng/mL para B₂; 8, 16, 24, 32, 40, 56 e 80 ng/mL para a G₁ e 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 7 e 10 ng/mL para G₂ com três injeções por concentração (RIBANI et al., 2004). Os dados de regressão linear foram obtidos com auxílio do *software* do equipamento, calculando o coeficiente de correlação linear (r) do instrumento.

A extração das micotoxinas das placas na ausência e presença dos compostos fenólicos do extrato de *Spirulina platensis* foi realizada após a separação dos micélios fúngicos do meio de cultura e secagem em estufa com circulação de ar a 90 °C até peso contante. As aflatoxinas foram extraídas com uma solução de acetonitrila-água (3:1), seguido por partição com hexano. A acetonitrila foi separada da água através da adição de cloreto de sódio, seguido por evaporação a vácuo a 50 °C. O resíduo foi ressuspensionado com uma mistura de metanol:clorofórmio 1:9 (v/v) e centrifugado a 3220 g a temperatura ambiente. Três alíquotas de 10 mL foram separadas em vidro âmbar e evaporados em banho-maria sob atmosfera de nitrogênio, sendo armazenadas a -10 °C (TANAKA et al., 2001). A identificação e quantificação das aflatoxinas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fluorescência (CLAE-FL). As condições cromatográficas foram as descritas anteriormente para os padrões.

A inibição da produção das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ foi calculada segundo a Equação 2.

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{C - T}{C} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

C (µg/mL) = média da concentração de aflatoxina no grupo controle (sem adição do extrato fenólico).

T ($\mu\text{g/mL}$) = média da concentração de aflatoxina no grupo tratamento (com adição do extrato fenólico).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Perfil dos fenóis no extrato metanólico de *Spirulina platensis*

A microalga *Spirulina platensis* apresentou teor de compostos fenólicos totais no extrato metanólico de 1,1 mg $\text{ác. gálico/g}_{S.platensis}$, valor inferior ao citado por Colla et al. (2007) de 3 mg $\text{tirosina/g}_{S.platensis}$ e por Tantawy (2011) de 2,58 mg/g. Estas variações podem estar relacionadas às diferenças de metodologias empregadas na extração da amostra, bem como as condições abióticas de cultivo (COLLA et al., 2007).

No entanto, o valor encontrado foi superior ao conteúdo fenólico do extrato de *Chlorella vulgaris*, 0,97 mg/g em sistema aquoso (LI et al., 2007), e para tecidos vegetais como banana 0,31 mg $\text{fenóis/g}_{amostra}$, maçã 1,0 mg/g, batata 0,99 mg/g, bagaço de laranja 0,061-0,084 mg/g (ZHOU et al., 2004) e 0,35 mg/g em polpa de berinjela (BADIALE-FURLONG et al., 2003).

Segundo Colla et al. (2007) e Parisi et al. (2009) os compostos fenólicos presentes na *Spirulina platensis* seriam os ácidos gálico, cafeico, salicílico, *trans*-cinâmico, clorogênico e sináptico. No entanto, no presente estudo só foram encontrados quatro destes compostos fenólicos presentes no extrato. Estas diferenças também podem estar associadas às diferenças de cultivo e a metodologia analítica empregada para extração.

Na Tabela 3 estão os tempos de retenção e os respectivos comprimentos de onda de absorção empregados para quantificar cada padrão utilizado neste trabalho.

Tabela 3: Faixa de tempos de retenção (t_R) e comprimentos de onda (λ_{max}) de absorção dos padrões de compostos fenólicos por CLAE –UV.

Padrão	t_R (minutos)	λ_{max} (nm)
Ácido gálico	3,1	270
Ácido cafeico	4,0	323
Ácido salicílico	10,9	261
Ácido <i>trans</i> -cinâmico	14,9	277

A Figura 2 apresenta o cromatograma da mistura de padrões dos compostos fenólicos em estudo.

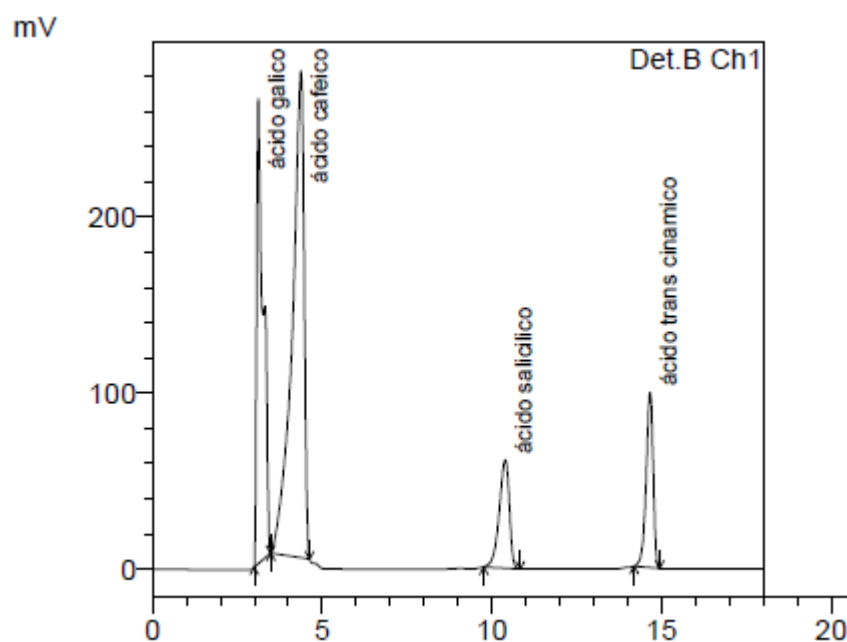


Figura 2: Cromatograma da mistura de padrões fenólicos nas condições do experimento.

Na Tabela 4 estão os coeficientes e as curvas analíticas dos padrões de ácidos fenólicos, bem como seus coeficientes de correlação.

Tabela 4: Curvas analíticas dos padrões de ácidos fenólicos.

Ácidos fenólicos	Curva analítica	r
Ácido gálico	$y = 97058,88 x - 129558,6$	0,9987041
Ácido cafeico	$y = 40102,72 x + 35500,59$	0,9980295
Ácido salicílico	$y = 4411,899 x - 8862,657$	0,9995716
Ácido <i>trans</i> -cinâmico	$y = 208924,5 x - 16602,11$	0,9992604

Todas as curvas apresentaram valores de correlação que possibilitaram quantificação confiável das amostras na faixa de linearidade determinada no instrumento.

O perfil do extrato fenólico de *Spirulina platensis* ilustrado no cromatograma da Figura 3, mostra a separação de quatro compostos conforme previsto na literatura.

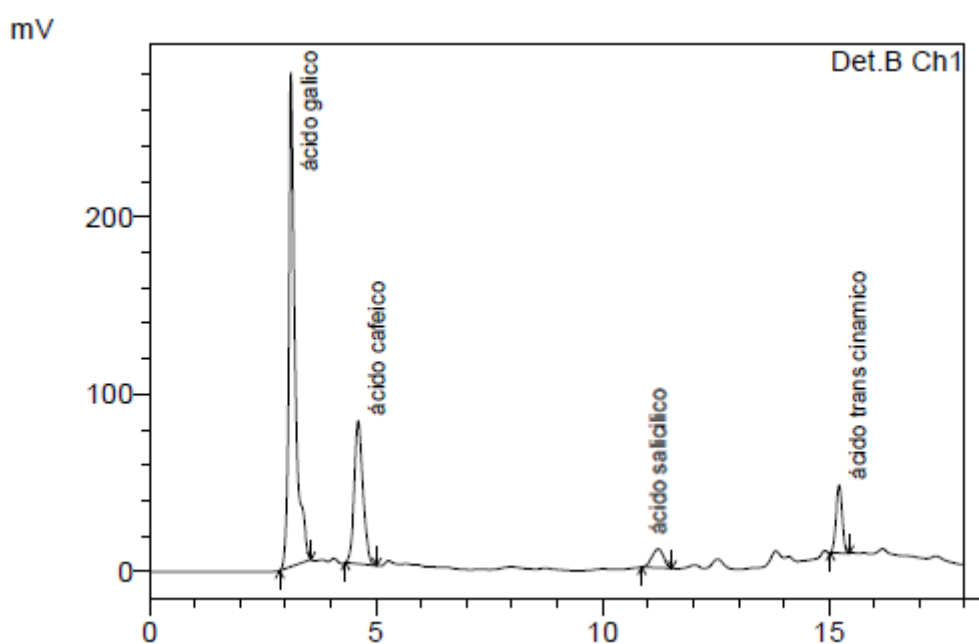


Figura 3: Cromatograma dos compostos fenólicos em *Spirulina platensis* por CLAE com coluna em fase reversa e detector UV.

Na Tabela 5 estão os níveis e percentuais dos compostos separados, estimados por grama de amostra.

Tabela 5: Quantificação por CLAE do teor de fenóis individuais na microalga *Spirulina platensis*.

Extrato fenólico <i>S.platensis</i>	Ácido gálico	Ácido cafeico	Ácido salicílico	Ácido <i>trans</i> - cinâmico
Quantificação CLAE – UV (µg/mL)	31,73±1,17	27,78±0,98	4,32±0,19	0,28±0,05
Quantificação CLAE – UV (µg/g)	396±11,3	347±7,6	54±2,5	3,5±0,6
Porcentagem (%)	49,5	43,3	6,7	0,43

O somatório do conteúdo dos ácidos fenólicos identificados no extrato de *Spirulina platensis* perfazem cerca de 80% (64,11 µg/mL) do conteúdo fenólico total, quantificadas através do método espectrofotométrico (81 µg_{fenóis}/mL_{S.platensis}), ou seja, 20% podem decorrer da presença de interferentes que levam a super-estimação do conteúdo fenólico total do extrato. Esta diferença de resultados ocorre, pois na determinação do conteúdo total de fenóis são quantificadas todas as substâncias que possuem ao menos um anel fenólico, enquanto que no método por cromatografia líquida são quantificados apenas os compostos possíveis de ser separados e quantificados dentro dos limites de detecção do método adotado.

Muitos autores têm publicado resultados sobre o conteúdo de fenóis totais em microalgas (LI et al., 2007; COLLA et al., 2007; SOUZA et al., 2010; 2011), mas são poucas as informações sobre o conteúdo de fenóis específicos em microalgas. Klejdus et al. (2009) separaram e identificaram fenóis de microalgas por espectrometria de massa, entre elas a *Spirulina platensis* apresentou em seu perfil cromatográfico 0,169 µg/g de ácido cafeico, 0,072 µg/g de ácido clorogênico, 0,254 µg/g de ácido vanílico e 2,23 µg/g de ácido p-hidroxibenzoico, valores muito inferiores aos encontrados neste trabalho. Qualitativamente também foram distintos dos determinados nestas condições analíticas de cultivo.

3.2 Ensaio de atividade antifúngica e antiaflatoxina

A evolução do desenvolvimento da biomassa de *A. flavus* durante 21 dias está descrita na Figura 4. Os resultados indicaram que o halo de crescimento (cm) do micélio se mostrou consideravelmente reduzido com o aumento da concentração de extrato fenólico, embora este tenha aumentado durante o tempo de cultivo. Resultados semelhantes foram encontrados por Tian et al. (2012) no estudo de inibição do crescimento micelial do *Aspergillus flavus* com a adição de óleo essencial de *Cinnamomum jensenianum*.

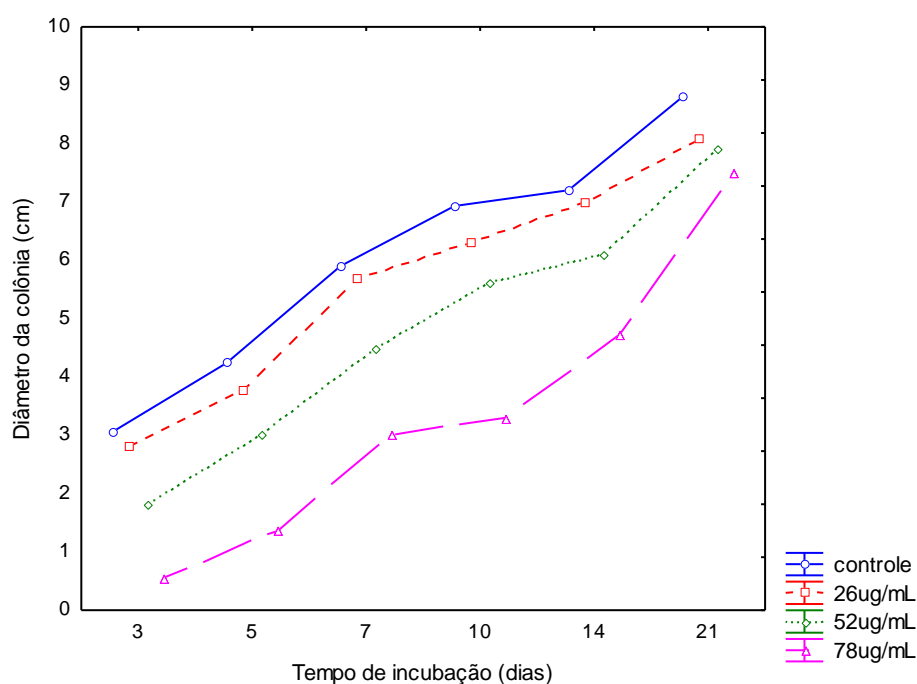


Figura 4: Efeitos das diferentes concentrações de extrato fenólico de *Spirulina platensis* no crescimento radial do *Aspergillus flavus*. Os valores são médias ($n = 3$) \pm desvios padrão.

A eficácia do extrato fenólico de *Spirulina platensis* sobre o desenvolvimento do *Aspergillus flavus* está indicada como porcentagem de inibição na Figura 5.

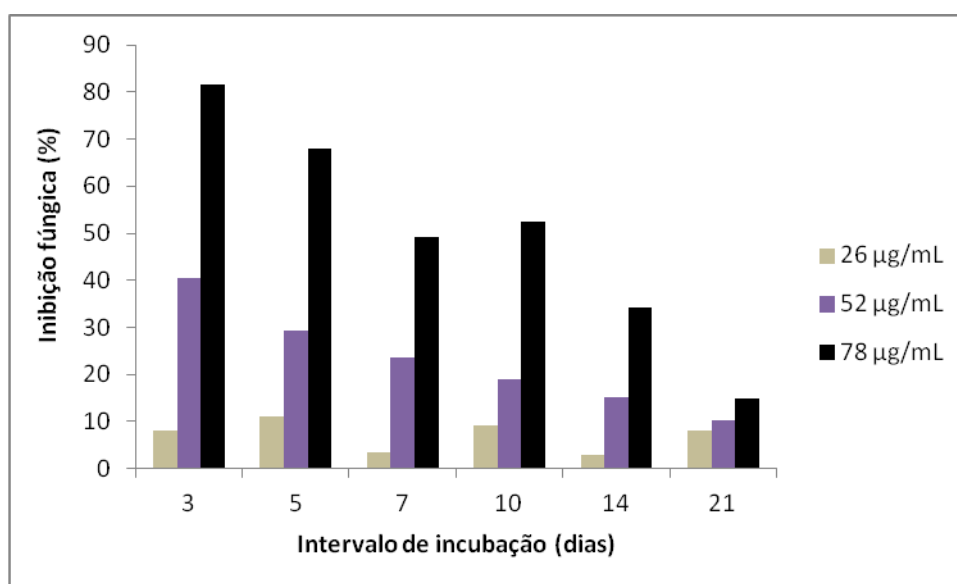


Figura 5: Porcentagem de inibição das diferentes concentrações de extrato fenólico sobre o desenvolvimento do *Aspergillus flavus*.

O extrato fenólico adicionado na concentração de 78 µg/mL inibiu o desenvolvimento do *Aspergillus flavus* até o 14^o dia de cultivo, em média em valores superiores a 50% em relação ao grupo controle. Sendo assim, esta concentração foi utilizada para estudo da inibição da produção de aflatoxinas com a adição de compostos fenólicos extraídos da *Spirulina platensis*. A Figura 6 ilustra a inibição do desenvolvimento fúngico do *Aspergillus flavus* na presença do extrato fenólico da *Spirulina platensis* na mencionada concentração.

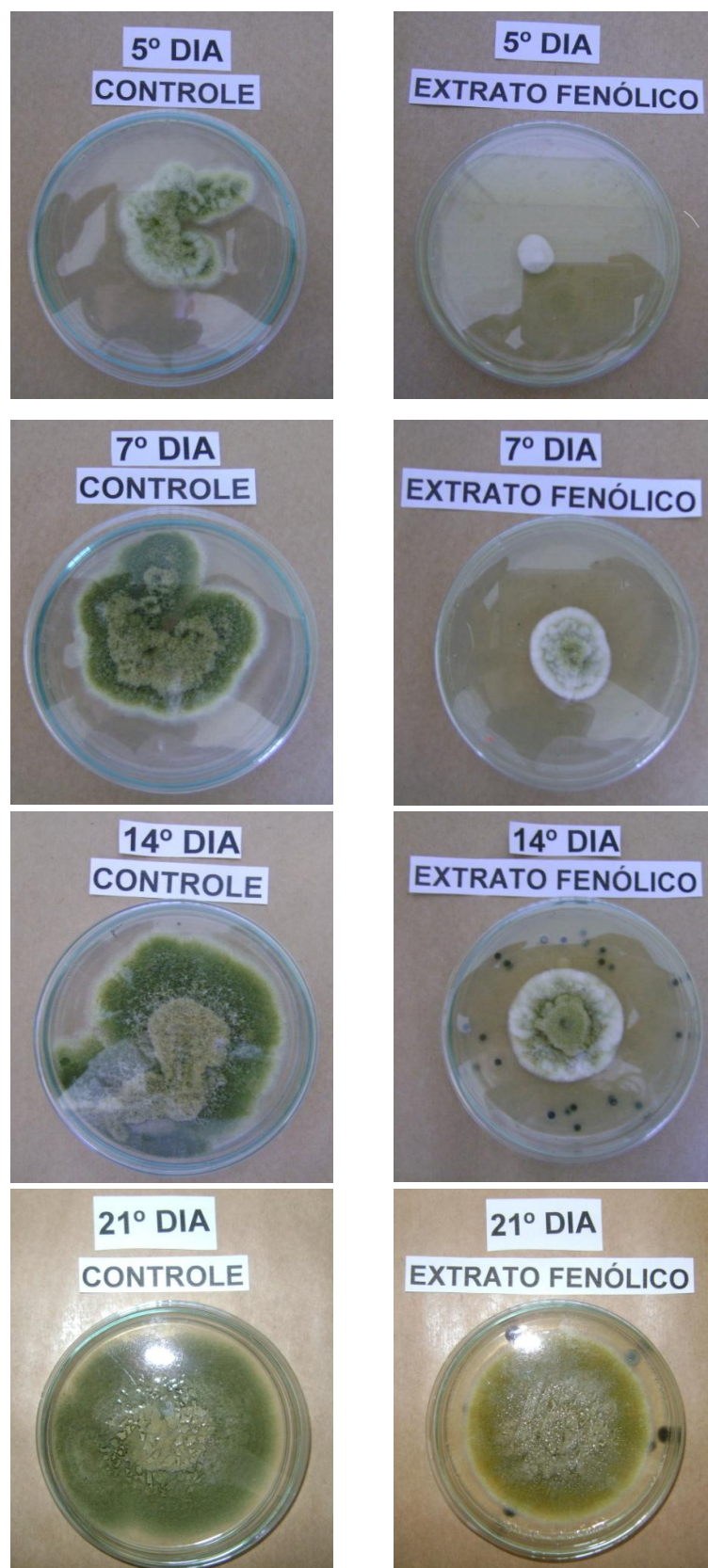


Figura 6: Zonas de inibição do extrato de *Spirulina platensis* (78 µg/mL) sobre *Aspergillus flavus* no 5°, 7°, 14° e 21° dia de incubação.

A eficácia de um composto, com propriedades de inibir naturalmente o desenvolvimento fúngico, é dependente também, de sua capacidade de inibir a síntese de aflatoxinas, para que assim possa ser utilizado como um conservante de alimentos seguro e eficaz. Diante disso, o extrato fenólico foi aplicado em placas de Petri para análise da sua capacidade de inibir a produção de aflatoxinas. Para isto, foi estudada a metodologia de separação e identificação das aflatoxinas para posterior quantificação da inibição da produção de aflatoxinas pelo extrato fenólico de *Spirulina platensis* comparado ao grupo controle (sem adição de extrato fenólico).

As melhores condições cromatográficas para quantificação das micotoxinas estão descritas na Tabela 6.

Tabela 6: Condições cromatográficas para as micotoxinas AFAB₁, AFAB₂, AFAG₁ e AFAG₂.

Parâmetros	CLAE-UV-FL
Coluna	Supelco Bio Wide Pore 10 µm C18 (25 cm x 4,6 mm)
Fase Móvel	Água acidificada (99:1) metanol:acetonitrila (60:28:12)
Vazão da fase móvel	1,0 mL/min
Alça de injeção	20 µL
Tempo de corrida	20 minutos
Detector AFAs	Fluorescência (FL)
t _R AFAB ₁	17,3 minutos
t _R AFAB ₂	13,5 minutos
t _R AFAG ₁	11,3 minutos
t _R AFAG ₂	9,0 minutos

A Figura 7 apresenta o cromatograma de separação da mistura de padrões das aflatoxinas, que mostra os tempos de retenção das aflatoxinas na mistura, os picos não identificados provavelmente sejam picos “fantasmas” de impurezas dos solventes utilizados nas fases móveis.

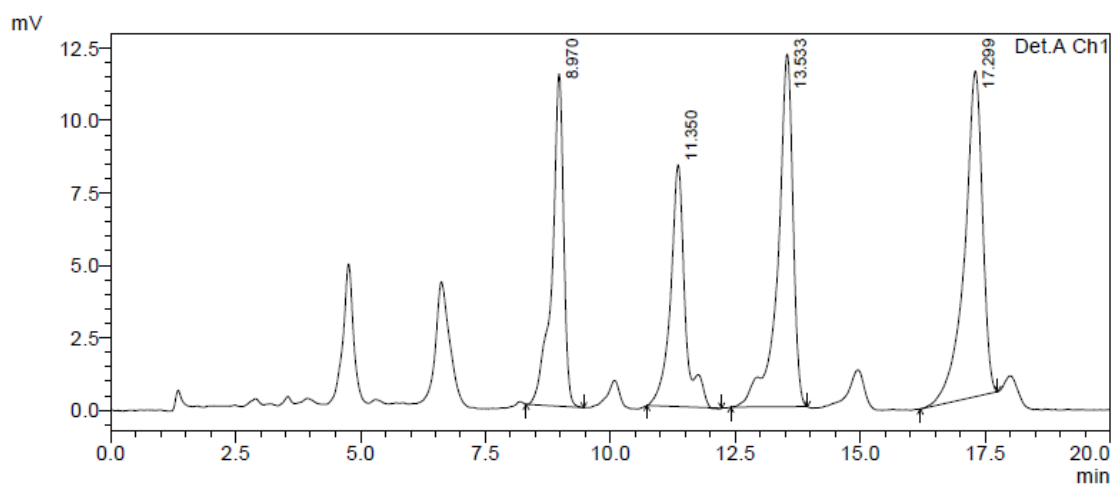


Figura 7: Cromatogramas das aflatoxinas G₂, G₁, B₂ e B₁.

A eficácia do extrato fenólico de *Spirulina platensis* na produção de aflatoxinas por *A. flavus* em meio Ágar Batata Dextrose está mostrada na Tabela 7.

No presente estudo, a espécie estudada foi a de *Aspergillus* aflatoxigênico produzindo diferentes níveis de aflatoxinas. Não há relato até a atualidade sobre a capacidade do extrato fenólico de *Spirulina platensis* em inibir aflatoxinas por este fungo.

Tabela 7: Efeito do extrato fenólico de *Spirulina platensis* sobre a produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus*.

Tempo incubação (dias)	AFB ₁ (µg/mL)		AFB ₂ (µg/mL)		AFAG ₁ (µg/mL)		AFAG ₂ (µg/mL)	
	C	T	C	T	C	T	C	T
3	24,1	0,0	0,20	0,0	7,4	0,0	70,8	20,6
5	30,4	0,0	2,1	0,0	30,6	0,0	62,4	21,0
7	58,9	0,0	4,0	0,31	30,9	0,0	50,7	30,2
10	88,4	0,0	9,2	1,97	110,3	52,0	85,1	26,2
14	147,6	41,2	18,5	5,8	160,5	0,0	131,2	58,6
17	289,5	65,2	18,4	4,4	210,4	76,8	91,6	76,8
21	441,3	112,0	16,4	4,6	217,1	99,4	88,2	51,0

C = grupo controle (sem adição de extrato fenólico)

T = grupo tratamento (com adição de extrato fenólico)

O extrato fenólico de *Spirulina platensis* diminuiu a concentração de todas as aflatoxinas estudadas e em todos os intervalos avaliados, comprovando que além de diminuir o desenvolvimento do *A.flavus*, também diminuiu a síntese da produção de metabólitos tóxicos aos animais e humanos.

Kumar et al. (2010) estudaram a redução do crescimento de *Aspergillus flavus* e *Hordeum Vulgare* e sua produção de AFAB₁ devido à presença de alguns compostos fenólicos no óleo de *Ocimum sanctum L.* Foi evidente que o eugenol (61,30%), principal componente do óleo, desempenhou papel fundamental em suas atividades antifúngicas e antiaflatoxigênicas.

A Tabela 8 mostra os resultados das inibições da síntese das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ produzida por *A. flavus* em Agar Batata Dextrose na presença de extrato fenólico de *Spirulina platensis*. A taxa de inibição foi calculada considerando a ausência de produção de micotoxinas como a inibição de 100%.

Tabela 8: Porcentagem de inibição da produção de aflatoxinas por extrato de *Spirulina platensis*.

Tempo de incubação (Dias)	Inibição da síntese de aflatoxinas (%)			
	AFAB ₁	AFAB ₂	AFAG ₁	AFAG ₂
3	100	100	100	70,9
5	100	100	100	66,3
7	100	92,3	100	40,4
10	100	78,6	52,8	69,2
14	72	68,6	100	55,3
17	77,4	76	63,5	16
21	74,6	71,9	54,2	42,1

O extrato de *Spirulina platensis* inibiu a produção de todas as aflatoxinas estudadas em todos intervalos de multiplicação do *Aspergillus flavus*, sendo importante salientar que a AFAB₁, metabólito mais tóxico entre todas as classes de aflatoxinas, foi inibida em 100% com relação ao grupo controle, até o 10^o dia de experimento.

Ficou demonstrado que o extrato fenólico foi um inibidor natural da biossíntese de aflatoxina, eficaz, que poderia ser utilizado como aditivo sem toxicidade para grãos e seus derivados ou para alimentos (EL-NAGERABI et al., 2012).

Cabe salientar que a inibição da produção de AFAB₁ não pode ser totalmente atribuída à reduzida multiplicação fúngica, mas pode ser devido à inibição do catabolismo de carboidratos do *A. flavus*, agindo sobre algumas enzimas-chave, reduzindo sua capacidade de produzir aflatoxinas como tem sido relatado por Tian et al. (2011) e Prakash et al. (2011), visto que após o 10^o dia inicia a produção.

Sandosskumar et al. (2007) estudaram a desintoxicação de aflatoxinas por compostos extraídos de plantas, produtos vegetais, ou por seus extratos assegurando que são mais seguros que a desintoxicação por métodos físicos ou químicos (amonização, formaldeído hidróxido de cálcio), relatando que o alho (*Allium sativum* L.) e a cebola (*Allium cepa* L.) incubados em raízes contendo 70 mg de aflatoxina B₁ por 5 dias, causaram uma redução no nível de aflatoxina de 58,5%.

O presente estudo tem, portanto, demonstrado que os compostos fenólicos podem ter uso potencial em proteger os produtos alimentícios contra a multiplicação do *A. flavus* e também da contaminação por aflatoxinas. Além disso, podem ser empregados para o desenvolvimento de novos tipos de fungicidas e no controle efetivo de patógenos resistentes a estes fungicidas (AHN et al., 2005; TIAN et al., 2012).

4. CONCLUSÃO

Foram encontrados quatro componentes fenólicos no extrato metanólico de *Spirulina platensis*, que na forma não purificada estes conseguiram inibir o crescimento fúngico e a produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus*. Outros estudos estão sendo realizados para os componentes individuais e sua atividade antifúngica e antimicotoxinas contra outros micro-organismos que contaminam alimentos, para a sua possível aplicação como conservante natural de alimentos.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABEDIN, R.M.A.; TAHA, H.M. Antibacterial and antifungal activity of cyanobacteria and green microalgae, evaluation of medium components by Plackett-Burmann Design for antimicrobial activity of *Spirulina platensis*. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v. 3, n. 1, p. 22-31, 2008.

AHN, Y.J.; LEE, H.S.; OH, H.S.; KIM, H.T.; LEE, Y.H. Antifungal activity and mode of action of Galla rhois-derived phenolics against phytopathogenic fungi. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 81, p. 105–112, 2005.

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

BADIALE-FURLONG, E.; COLLA, E.; BORTOLATO, D S.; BAISH, A L M.; SOUZA-soares, L A. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. **Revista Vetor**, v. 4, n. 13, p. 105-14, 2003.

- COLLA, L. M., BADIALE-FURLONG, E. COSTA, J.A.V. Antioxidant Properties of *Spirulina (Arthospira) platensis* Cultivated Under Different Temperatures and Nitrogen Regimes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 1, p. 161-167, 2007.
- COSTA, J.A.V.; COLLA, L.M.; DUARTE FILHO, P.F.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 603–607, 2002.
- COSTA, J.A.V.; COLLA, L.M.; DUARTE FILHO, P. *Spirulina platensis* growth in open raceway ponds using fresh water supplemented with carbon, nitrogen and metal ions. **Zeitschrift für Naturforsch**, v. 58, p76–80, 2004.
- DUTRA, F.L.G.; HOFFMANN-RIBANI, R.; RIBANI, M. Determinação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência isocrática durante estacionamento da erva-mate. **Química Nova**, v.33, p.119-123, 2010
- EL-NAGERABI, S.A.F.; AL-BAHRY, S.N.; ELSHAFIE, A.E.; ALHILALI S. Effect of *Hibiscus sabdariffa* extract and *Nigella sativa* oil on the growth and aflatoxin B₁ production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* strains. **Food Control**, v. 25, p. 59-63, 2012.
- FERREIRA, D.; GUYOT, S.; MARNET, N.; DELGADILLO, I.; RENARD, C.; COIMBRA, M. A. Composition of phenolic compounds in a Portuguese pear (*Pyrus communis* L.var. S. Bartolomeu) and changes after sun-drying. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4537–4544, 2002.
- KILANI-JAZIRI, S.; BHOURI, W.; SKANDRANI, I.; LIMEN I.; CHEKIR-GHEDIRA, L., GHEDIRA, K. Phytochemical, antimicrobial, antioxidant and antigenotoxic potentials of *Cyperus rotundus* extracts. **South African Journal of Botany**, v. 77, p. 767–776, 2011.
- 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.
- KAUSHIK, P.; CHAUHAN, A. In vitro antibacterial activity of laboratory grown culture of *Spirulina platensis*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 48, p. 348-52, 2008.

- KLEJDUS, B.; KOPECKY, J.; BENESOVA, L.; VACEKA, J. Solid-phase/supercritical fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 763–771, 2009.
- KUMAR, A.; SHUKLA, R.; SINGH, P.; DUBEY, N. K. Chemical composition, antifungal and antiaflatoxic activities of *Ocimum sanctum* L. essential oil and its safety assessment as plant based antimicrobial. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 539–543, 2010.
- LI, H.B.; CHENG, K. W.; WONG, C.C.; FAN, K.W.; CHEN, F.; JIANG, Y. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. **Food Chemistry**, v. 102, p. 771–776, 2007.
- MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M.; ANDRADE, M. R., F.; TEIXIERA, G. G.; BRUSCH, L. R. F.; COSTA, J.A.V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. **Aquaculture**, v. 294, p. 60–64, 2009.
- OLIVEIRA, M. S.; DORS, G. C.; SOUZA-SOARES, L. A.; BADIALE-FURLONG, E. Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais. **Revista Alimentos e Nutrição**, v.18, n. 3, p. 267-275, 2007.
- 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.
- PARISI, A.S.; YOUNES, S.; REINEHR, C. O.; COLLA, L. M. Assessment of the antibacterial activity of microalgae *Spirulina platensis*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 97-301, 2009.
- PRAKASH, B.; SINGH, P.; MISHRA, P.; KUMAR, A.; DUBEY, N.K. Safety assessment of *Zanthoxylum alatum* Roxb. essential oil, its antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activity and efficacy as antimicrobial in preservation of *Piper nigrum* L. fruits, **International Journal of Food Microbiology**, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.007, 2011.
- RAHMAN, A.; KANG, S. C. In vitro control of food-borne and food spoilage bacteria by essential oil and ethanol extracts of *Lonicera japonica* Thunb. **Food Chemistry**, v. 116, n. 3, p. 670–675, 2009.

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

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.

SOFOS, J.N.; BEUCHAT, L.R.; DAVIDSON, P.M., JOHNSON, E.A. Naturally occurring antimicrobials in food, an interpretive summary. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 28, p. 71–72, 1998.

SOUZA, M. M.; OLIVEIRA, M. S.; ROCHA, M.; FURLONG, E. B. Antifungal activity evaluation in phenolic extracts from onion, rice bran, and *Chlorella phyrenoidosa* **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**, v. 35, n. 6, p. 1050-1058, 2011.

SRIVASTAVA, B.; SINGH, P.; SHUKLA, R.; DUBEY, N.K. A novel combination of the essential oils of *Cinnamomum camphora* and *Alpinia galanga* in checking aflatoxin B1 production by a toxigenic strain of *Aspergillus flavus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 24, p. 693–697, 2008.

TANAKA, T.; YONEDA, A.; INOUE, S.; SUGIURA, Y.; UENO, Y. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gás chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, n. 882, p. 23-28, 2001.

TANTAWY, S. T.A. Biological potential of cyanobacterial metabolites against some soil pathogenic fungi. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 9, n. 1, p. 663-666, 2011.

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.

WILLIAMS, J. H.; PHILLIPS, T. D.; JOLLY, P. E.; STILES, J. K.; JOLLY, C. M.; Aggarwal, D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology,

exposure, potential health consequences, and interventions. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, n. 5, p. 1106–1122, 2004.

XU, G.; YE, X.; LIU, D.; MA, Y.; CHEN, J. Composition and distribution of phenolic acids in Ponkan (*Citrus poonensis* Hort. ex Tanaka) and Huyou (*Citrus paradisi* Macf. Changshanhuoyou) during maturity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 382– 389, 2008.

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

CAPITULO IV

5. CONCLUSÕES GERAIS

A correlação entre o conteúdo de glicosamina e ergosterol produzidos pela biomassa fúngica de *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus flavus* possibilitaram medida confiável para avaliação objetiva da multiplicação da biomassa fúngica através de suas quantificações.

O planejamento experimental realizado mostrou que a melhor combinação das variáveis tempo, rotação e continuidade do processo podem ser previstas por um modelo matemático confiável e significativo. Os extratos fenólicos das microalgas *Spirulina platensis* e *Chlorella* sp. inibiram a produção de biomassa por *Rhizopus oryzae* sendo o primeiro mais eficiente como inibidor de produção de membrana e parede celular.

O conteúdo de glicosamina na biomassa fúngica é o método mais adequado para investigar o efeito de extratos de *Spirulina platensis* no desenvolvimento de biomassa fúngica de *Aspergillus flavus* pois sua produção foi linear ao longo do tempo no experimento controle e dentre os componentes testados foi o mais afetado pelos fenóis no meio de cultura. O extrato fenólico de *Spirulina platensis* mostrou atividade antifúngica, inibindo a produção de glicosamina em até 56% para este micro-organismo.

As microalgas *Spirulina platensis* e *Chlorella* sp. são fontes de compostos fenólicos com propriedades antioxidantes, sendo que a primeira possui o maior conteúdo de compostos fenólicos (1100 µg GAE/mL). Ela também inibiu de forma mais eficiente o radical DPPH, o escurecimento enzimático e a peroxidação lipídica

A microalga *Chlorella* sp. também apresentou atividade antioxidante frente a todos os métodos estudados, porém com valores inferiores aos apresentados pelo extrato fenólico de *Spirulina platensis*, sendo portanto esta última a mais promissora para utilização de seus compostos antioxidantes naturais.

Foram encontrados quatro componentes fenólicos no extrato metanólico de *Spirulina platensis* e na forma não purificada eles conseguiram inibir o crescimento fúngico e a produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus*. Outros estudos estão sendo realizados para os componentes individuais e sua atividade antifúngica e antimicotoxinas contra outros micro-organismos que contaminam alimentos, para a sua possível aplicação como conservante natural de alimentos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABEDIN, R.M.A.; TAHA, H.M. Antibacterial and antifungal activity of cyanobacteria and green microalgae, evaluation of medium components by Plackett-Burmann Design for antimicrobial activity of *Spirulina platensis*. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v. 3, n. 1, p. 22-31, 2008.

ADHIKARI, A., SEN, M.M., GUPTA-BHATTACHARYA, S. and CHANDA, S. Airborne viable, non-viable, and allergenic fungi in a rural agricultural area of India: A 2-year study at five outdoor sampling stations. **Science Total Environment**, v. 326, p. 123-141, 2004.

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

AHMADI, F.; SADEGHI, S.; MODERRESI, M.; ABIRI, R.; MIKAELI, A. Chemical composition, in vitro anti-microbial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanolic extract of *Hymenocrater longiflorus* of Iran. **Food and Chemistry and Toxicology**, v. 48, p. 1137-1144, 2010.

AHN, Y.J.; LEE, H.S.; OH, H.S.; KIM, H.T.; LEE, Y.H. Antifungal activity and mode of action of Galla rhois-derived phenolics against phytopathogenic fungi. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 81, p. 105–112, 2005.

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

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

ALBUQUERQUE, P.M. **Estudo da produção de proteína microbiana a partir do bagaço da maçã**. Florianópolis: UFSC, 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa de Catarina, 2003.

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

AMBROSI, M. A.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M. Propriedades de saúde de *Spirulina* spp.. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 109-117, 2008.

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

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

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

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

AOAC. **Association of Official Analytical Chemists**. Official Methods of analysis international, 17 th, CD-ROM, William Horwitz, 2000.

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

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

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

BADIALE-FURLONG, E.; COLLA, E.; BORTOLATO, D S.; BAISH, A L M.; SOUZA-soares, L A. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. **Revista Veter**, v. 4, n. 13, p. 105-114, 2003.

BAKAN, B; et al. Possible role of Plant Phenolics in the Production of Trichothecenes by *Fusarium graminearum* strains on different Fractions of Maize Kernels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2826-2831, 2003.

BANDELIER, S.; RENAUD, R.; DURAND, A. Production of gibberellic acid by fed-batch solid state fermentation in an aseptic pilot-scale reactor. **Process Biochemistry**, v. 32, n. 2, p. 141 – 145, 1997.

BARAJAS-ACEVES, M. HASSAN, R. Tinoco and R. Vazquez-Duhalt, Effect of pollutants on the ergosterol content as indicator of fungal biomass. **Journal of Microbiological Methods**, v. 50, p. 227–236, 2002.

BEHALOVÁ, B.; BLÁHOVA, M.; BEHAL, V. Regulation of sterolbiosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Microbiology**, v. 39, p. 287-290, 1994.

BELAY, A. The potential application of *Spirulina (Arthrospira)* as a nutritional and therapeutic supplement in health management. **Journal of the American Nutraceutical Association**, v. 5, n. 2, p. 27-48, 2002.

BELEWA, V.; BAIJNATH, H.; SOMAI, B.M. Aqueous extracts from the bulbs of *Tulbaghia violacea* are antifungal against *Aspergillus flavus*. **Journal of Food Safety**, v. 31, n. 2, p. 176-184, 2011.

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

BERNAL, J.; MENDIOLA, J.A.; IBÁÑEZ, E.; CIFUENTES, A. Advanced analysis of nutraceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, p. 758–774, 2011.

BITTENCOURT, A. B. F.; OLIVEIRA, C. A. F.; DILKIN, P.; CORREA, B. Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in São Paulo, Brazil. **Food Control**, n. 16, p. 117-120, 2005.

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

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

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

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223–253, 2004.

CAMO, J.; BELTRÁN, J. A.; RONCALÉS, P. Extension of the display life of lamb with an antioxidant active packaging. **Meat Science**, v. 80, n. 4, p. 1086-1091, 2008.

CARVALHO, J. C.; PANDEY, A.; OISHI, B. O.; BRAND, D.; RODRIGUEZ-LÉON, J. A.; SOCCOL, C. R. Relation between growth, respirometric analysis and biopigments production from *Monascus* by solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 29, n. 3, p. 262-269, 2006.

CARVALHO, M. P. **Avaliação da atividade antimicrobiana dos basidiomicetos *Lentinula edodes*, *Lentinus crinutus*, *Amauroderma* sp. e *Pycnoporus sanguineus***. Porto Alegre: UFRGS, 2007. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

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

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

CHU, W. L.; LIM, Y.W.; RADHAKRISHNAN, A.K.; LIM, P.E. Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, n. 53, p. 2-8, 2010.

COLLA, L. M., BADIALE-FURLONG, E. COSTA, J.A.V. Antioxidant Properties of *Spirulina (Arthrospira) platensis* Cultivated Under Different Temperatures and Nitrogen Regimes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 1, p. 161-167, 2007.

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

COSTA, J.A.V.; COLLA, L.M.; DUARTE FILHO, P. *Spirulina platensis* growth in open raceway ponds using fresh water supplemented with carbon, nitrogen and metal ions. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 58, p. 76–80, 2004.

COSTA, J.A.V.; COLLA, L.M.; DUARTE, P.F.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 603–607, 2002.

- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, p. 564-582, 1999.
- DAVIDSON, P. M.; PARISH, M. E. Methods for Testing the Efficacy of Food Antimicrobials. **Food Technology**, v.12, p. 148-155, 1989.
- DAVIS, M. W.; LAMAR, R. T. Evaluation of methods to extract ergosterol for soil fungal biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 24, n. 3, p. 189-198, 1992.
- DE SOUZA, E.L.; LIMA, E.O.; FREIRE, K.R.L.; DE SOUSA, C.P. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 245–250, 2005.
- DEACON, J. W. **Structure and ultrastructure**: modern mycology. Cambridge: [s.n.], 1998. 35 p.
- DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.
- DEL RÍO, J. A.; BÁIDEZ, A. G.; BOTÍA, J. M.; ORTUNO, A. Enhancement of phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea* L.) and their influence on resistance against *Phytophthora* sp. **Food Chemistry**, v. 83, p. 75-78, 2003.
- DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas Produtos e Aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, 2006.
- DESGRANGES, C.; VERGOLNAN, C.; GEORGES, M.; DURAND, A. Biomass Estimation in Solid State Fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 200-205, 1991.
- DISCH, A.; SCHWENDER, J.; MULLER, C.; LICHTENTHALER, H. K.; ROHMER, M. Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714. **Biochemistry**, v. 30, p. 427-433, 1998.
- DUARTE, A. et al. Evaluation of the antioxidant activity using the α -carotene/linoleic acid system and the DPPH scavenging method. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p 34-40, 2006.
- EL-NAGERABI, S.A.F.; AL-BAHRY, S.N.; ELSHAFIE, A.E.; ALHILALI S. Effect of *Hibiscus sabdariffa* extract and *Nigella sativa* oil on the growth and aflatoxin B₁ production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* strains. **Food Control**, v. 25, p. 59-63, 2012.

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

ESTRADA, J. E.; BESCÓS, P.; VILLAR DEL FRESNO, A. M. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **Farmaco**, v. 56, p. 497-500, 2001.

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

FENICE, M.; SERMANI, G.G.; FEDERICI, F.; D'ANNIBALE, A. Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. **Journal of Biotechnology**, v. 100, p. 77 – 85, 2003.

FERREIRA, D.; GUYOT, S.; MARNET, N.; DELGADILLO, I.; RENARD, C.; COIMBRA, M. A. Composition of phenolic compounds in a Portuguese pear (*Pyrus communis* L.var. S. Bartolomeu) and changes after sun-drying. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4537–4544, 2002.

FONSECA, E. W. N.; PICCOLI, R. H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.

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 do Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, n. 2, p. 87-98, 1999.

GALVÃO, J. G.; GUERREIRO, M. C.; SOUZA, J. A.; COURA, S. M. Uso do fungo *Fusarium oxysporum* como indicador de ametrina, através da medida de biomassa, pela quantificação do ergosterol. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n.4, p. 840-845, 2003.

GELMI C.; PÉREZ-CORREA, R.; GONZÁLEZ, A.; AGOSIN, E. Solid Substrate Cultivation of *Gibberella fujikuroi* on an Inert Support. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1227-1233, 2000.

GELMI, C.; PÉREZ-CORREA, R.; AGOSIN, E. Modelling *Gibberella fujikuroi* and GA₃ production in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1033-1040, 2002.

GESSNER, M.O.; CHAUVET, E. Growth and production of aquatic hyphomycetes in decomposing leaf litter. **Limnology & Oceanography**, v. 42, p. 496-505, 1997.

GESSNER, M.O.; E. CHAUVET, E. Ergosterol-to-biomass conversion factors for aquatic hyphomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 502-507, 1993.

GESSNER, M.O.; SCHWOERBEL, J. Fungal biomass associated with decaying leaf litter in a stream. **Oecologia**, v. 87, p. 602-603, 1991.

GRANT, L. F.; HARVEY, A. E. Quantitative measurement of ectomycorrhizae on plant roots. In: SCHENK, N. C. (Ed.). **Methods and principles of mycorrhizal research**. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1982. cap. 14, p. 157-164.

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

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

GUIMARÃES, L. F. L.; COLLINS, C. H. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO P. S. **Introdução à métodos cromatográficos**. Campinas: Unicamp, 1993. p. 183-238.

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.

GUTIERREZ-CORREA, M.; TENDERDY, R.P. Xylanase production by fungal mixed culture solid substrate fermentation on sugar cane bagasse. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 1, p. 45-47, 1998.

HAJIMAHMOODI, M., FARAMARZI, M. A., MOHAMMADI, N., SOLTANI, N., OVEISI, M. R., NAFISSI-VARCHEH, N. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, p.43–50, 2010.

HAQ, I. U.; ALI, S.; IQBAL, J. Effect of volume of culture medium on enhanced citric acid productivity by a mutant culture of *Aspergillus niger* in stirred fermentor. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, p. 302–306, 2003.

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

HARUTA, M.; MAJOR, I.T.; CHRISTOPHER, M.E.; PATTON, J.J.; CONSTABEL, C.P. A Kunits trypsin inhibitor gene family from trembling aspen (*Populus tremuloides*

Michx.): cloning, functional expression, and induction by wounding and herbivory. **Plant Molecular Biology**, v. 46, p. 347-359, 2001.

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.

HENRARD, A. S. A. **Cultivo semicontínuo das microalgas *Cyanobium sp.* e *Chlorella sp.*** Rio Grande: FURG, 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, 2009.

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

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.

HOLMES, R.A.; BOSTON, R.S.; PAYNE, G.A. Diverse inhibitors of aflatoxin biosynthesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, p. 559–572, 2008.

HUA-BIN, L.; KA-WING, C.; CHI-CHUN, W.; KING-WAI, F.; FENG, C.; YUE, J. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. **Food Chemistry**, v. 102, p. 771-776, 2007.

IKASARI, L.; MITCHELL, D.A. Two-Phase Model of the Kinetics of Growth of *Rhizopus oligosporus* in Membrane Culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, p. 619-627, 2000.

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

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

KALOGERIS, E.; INIOTAKI, F.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B.J. Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 86, p. 207-213, 2003.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 37, n. 2, p. 153-161, 2002.

KAUSHIK, P.; CHAUHAN, A. In vitro antibacterial activity of laboratory grown culture of *Spirulina platensis*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 48, p. 348-52, 2008.

KILANI-JAZIRI, S.; BHOURI, W.; SKANDRANI, I.; LIMEN I.; CHEKIR-GHEDIRA, L., GHEDIRA, K. Phytochemical, antimicrobial, antioxidant and antigenotoxic potentials of *Cyperus rotundus* extracts. **South African Journal of Botany**, v. 77, p. 767-776, 2011.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 2, n. 50, p. 213-218, 1999.

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

KLAMER M., BÅÅTH E. Estimation of conversion factors for fungal biomass determination in compost using ergosterol and PLFA 18:2_6,9. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 36, p. 57-65, 2004.

KLEJDUS, B.; KOPECKY, J.; BENESOVA, L.; VACEKA, J. Solid-phase/supercritical fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 763–771, 2009.

KUMAR, A.; SHUKLA, R.; SINGH, P.; DUBEY, N. K. Chemical composition, antifungal and antiaflatoxic activities of *Ocimum sanctum L.* essential oil and its safety assessment as plant based antimicrobial. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 539–543, 2010.

LI, H.B.; CHENG, K. W.; WONG, C.C.; FAN, K.W.; CHEN, F.; JIANG, Y. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. **Food Chemistry**, v. 102, p. 771-776, 2007.

LIMA, C. A. P.; ORSI, R. B.; DILKIN, P.; CORRÊA, B. Mycoflora and aflatoxicogenic derivatives of milled rice. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 1, n. 20, p. 37-39, 2000.

LIMA, V, L, A, G.; MELO, E, A.; MACIEL, M, A, S.; SILVA, B, S, G.; LIMA, D, E, S.. Fenólicos totais e atividade antioxidante do extrato aquoso de broto de feijão-mungo (vignaradiatal). **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 1, p. 53-57, 2004.

LIU, Q.; YAO, H. Antioxidant activities of barley seeds extracts. **Food Chemistry**, v.102, p. 732–737, 2007.

LOURENCO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas – Principios e Aplicações** – São Carlos: RiMa, 2006.

MALLOZZI, A. B.; CORRÊA, B. Fungos toxigênicos e micotoxinas. **Boletim Técnico do Instituto Biológico**, n. 12, p. 5-26, 1998.

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 & Technology**, v. 67, p. 187-195, 2001.

MARTIN, F.; DELARUELLE, C.; HILBERT, J. L. Na improved ergosterol assay to estimate fungal biomass in ectomycorrhizas. **Mycological Research**, Cambridge, v. 94, n. 9, p. 1059-1064, 1990.

MARTÍNEZ-VALVERDE, I.; PERIOGO, M. J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutricion**, v. 50, n. 1, 2000.

MATILLA P.; LAMPI A.M.; RONKAINEN R.; TOIVO J.; PIIRONEN V. Sterol and vitamin D₂ contents in some wild and cultivated mushrooms. **Food Chemistry**, v. 76 p. 293-298, 2002.

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.

MENDIOLA, J. A.; JAIME, L.; SANTOYO, S.; REGLERO, G.; CIFUENTES, A.; IBAÑEZ, E.; SEÑORANS, F. J. Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina platensis*. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1357–1367, 2007.

MENEZES, T. J. B. Fungos na indústria. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 2, 1992.

MICHELIN, D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; PAGANELLI, M. O.; CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 316-20, 2005.

MIRANDA, M. S.; CINTRA, R. G.; BARROS, S. B. M.; MANCINI- Mancini-Filho J. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p.1075-9, 1998.

MONTGOMERY H.J.; MONREAL C.M.; YOUNG J.C.; SEIFERTD K.A. Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, p. 1207-1217, 2000.

MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M.; ANDRADE, M. R., F.; TEIXIERA, G. G.; BRUSCH, L. R. F.; COSTA, J.A.V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. **Aquaculture**, v. 294, p. 60–64, 2009.

MORAIS, S.A.L., AQUINO, F.J.T., NASCIMENTO, P. M.; NASCIMENTO, E.A., CHANG, R. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café conilon submetido a diferentes graus de torra. **Química Nova**, v. 32, n.2, p. 327-331, 2009.

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

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMINGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H.; NUNEZ, M. J.; PARAJO, J. C. Natural antioxidants from residual sources (Review). **Food Chemistry**, v. 72, p. 145-171, 2001.

MULITERNO, A., MOSELE, P., C., COSTA, J., A., V., HEMKEMEIER, M., BERTOLIN, T., E., COLLA, L., M. Mixotrophic growth of *Spirulina platensis* in fed-batch mode. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 6, p. 1132-1138, 2005.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food (Review). **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95-111, 2004.

NAGEL, F. J. I.; TRAMPER, J.; BAKKER, M. S. N.; RINZEMA, A. Temperature Control in a Continuously Mixed Bioreactor for Solid-State Fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, p. 219-230, 2001.

NAIDU, A. S. **Natural Food Antimicrobial Systems**. CRC Press, 2000.

NEMEC, T.; JERNEJC, K.; CIMERMAN, A. Sterols and fatty acids of different *Aspergillus* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 149, p. 201-205, 1997.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**, 2º ed., Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2003.

NEWELL, S. Y.; ANUFFI, T. L.; FALLON, R. D. Fundamental procedures for determining ergosterol content of decaying plant material by liquid chromatography. **Applied Environment Microbiology**, v. 54, p. 1876-1879, 1988.

NGUEFACK, J.; BUDDE, B.B.; JAKOBSEN, M. Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 395-400, 2004.

NOPHARATANA, M.; MITCHELL, D. A.; HOWES, T. Use of confocal microscopy to follow the development of penetrative hyphae during growth of *Rhizopus oligosporus* in an artificial solid-state fermentation system. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, n. 4, p. 438-447, 2003.

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

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 459-466, 2003.

OLIVEIRA, I.; SOUSA, A.; FERREIRA, C. F. R.; BENTO, A.; ESTEVINHO, L.; PEREIRA, J. A. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2326-2331, 2008.

OLIVEIRA, M. S. **Disponibilização de compostos funcionais em farelo de arroz fermentado em estado sólido**. Rio Grande: FURG, 2009. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, 2009.

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. **Revista Alimentos e Nutrição**, v.18, n. 3, p. 267-275, 2007.

OLVERA-RAMIREZ, R.; CEDILO, M. C.; VILLANUEVA, R. O. C.; JERONIMO, F. M.; NOYOLA, T. P.; LEAL, E. R. Growth evolution and bioproducts characterization of *Calothrix* sp. **Bioresource Technology**, v. 72, p. 121-124, 2000.

OOIJKAAS, L. P.; TRAMPER, J.; BUITELAAR, R. M. Biomass Estimation of *Coniothyrium minitans* in Solid-State Fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 480-486, 1998.

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

PALMA, M. B. P **Produção de xilases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido**. 2003. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153-1169, 2000.

PARISI, A.S.; YOUNES, S.; REINEHR, C. O.; COLLA, L. M. Assessment of the antibacterial activity of microalgae *Spirulina platensis*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 97-301, 2009.

PEELER, T. C.; STEPHENSON, M. B.; EINSPAHR, K. J.; TOMPSON, G. A. Lipid Characterization of an enriched plasma membrane fraction of *Dunaliella salina* Grown in media of varying salinity. **Plant Physiology**, v. 89, p. 970-976, 1989.

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

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

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

PINERO ESTRADA, J.E.; BERMEJO BESCÓS, P.; VILLAR DEL FRESNO, A.M. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **Farmaco**, 56, 497-500, 2001.

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.

PRAKASH, B.; SINGH, P.; MISHRA, P.; KUMAR, A.; DUBEY, N.K. Safety assessment of *Zanthoxylum alatum* Roxb. essential oil, its antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activity and efficacy as antimicrobial in preservation of Piper nigrum L. fruits, **International Journal of Food Microbiology**, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.007, 2011.

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

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

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os Reinos dos Fungos – volume 1**. Santa Cruz do Sul: Editora da UNISC, 2002. 226p.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os Reinos dos Fungos – volume 2**. Santa Cruz do Sul: Editora da UNISC, 2004. 603p.

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

QUEIROZ, M. I.; LOPES, E. J.; ZEPKA, L. Q.; NETTO, F. M. Caracterização da fração Proteica da Cianobactéria *Aphanothece microscópica* Nägeli cultivada no efluente da parboilização do arroz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 482-488, 2006.

QUEIROZ, M. I.; ZEPKA, L. Q.; LOPES, E. J.; BASTOS, R. Evaluation of single cell protein production by *Aphanothece microscópica* Nägeli in tecbatch reactor. **Food Science and Biotechnology**, v.13, p. 130-141, 2004.

QUEIROZ, M. L. S.; BIANCOLETTI, C.; VALADARES, M. C.; DANTAS, D. C. M.; SANTOS, L. M. B. Effects of *Chlorella vulgaris* extract on cytokines productions in

Listeria monocytogenes infected mice. **Immunopharmacol and Immunotoxicology**, v. 24, p. 483-496, 2002.

QUEIROZ, M.I.; LOPES, E.J.; ZEPKA, L. Q.; BASTOS, R.; GOLDBECK, R. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled Rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor. **Bioresource Technology**, v.98, p. 2163-2169.

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

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

RAHMAN, A.; KANG, S. C. In vitro control of food-borne and food spoilage bacteria by essential oil and ethanol extracts of *Lonicera japonica* Thunb. **Food Chemistry**, v. 116, n. 3, p. 670–675, 2009.

RAMAKRISHNA, N.; LACEY, J.; SMITH, J. E. Effects of water activity and temperature on the growth of fungi interacting on barley grain. **Mycological Research**, v. 97, n. 11, p. 1393-1402, 1993.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006

RANIA, H. F.; KASSEM, M.A. Enhancement of famotidine dissolution rate through liquid solid tablets. Formulation. *In vitro* and *in vivo* evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 993-1003, 2008.

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

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

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

REICHERT, C. C., REINEHR, C. O., COSTA, J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, p. 23-28, 2006.

REICHERT, C. C., REINEHR, C. O., COSTA, J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, p. 23-28, 2006.

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

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

ROBARDS, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables (Review). **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 657-691, 2003.

ROCHE, N.; DURAND, A. Kinetics of *Thermoascus auranticus* Solid-State Fermentation on Sugar-Beet Pulp – Polysaccharide Alteration and Production of related Enzymatic Activities. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 45, p. 584-588, 1996.

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

ROESLER, R.; MALTA, L. G. CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n.1, p. 53-60, 2007.

ROGINSKY, V, LISSI, EA. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 2005.

ROMANO, I., BELLITTI, R., NICOLAUS, B., LICIA LAMA, M., MANCA, M. C., PAGNOTTA, E., GAMBACORTA, A. Lipid profile: a chemotaxonomic marker for classification of a new cyanobacterium in *Spirulina* genus. **Phytochemistry**, v. 54, p. 289-294, 2000.

RUENGRUGLIKIT, C.; HANG, Y.D.L. (+)-lactic acid production from corncobs by *Rhizopus oryzae* NRRL-395. **Lebensmittel-Wissenschaft, Technologie**, v. 36, n. 6, p. 573-575, 2003.

RUZICKA, S.; EDGERTON, D.; NORMAN, M.; HILL, T. The Utility of ergosterol as a bioindicator of fungi in temperate soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, n. 7, p. 989-1005, 2000.

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

SANCHEZ, E.; HEREDIA, N.; GARCÍA, S. Inhibition of growth and mycotoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by extracts of Agave species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 98, n. 3, p. 271-279, 2005.

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

SANTOS, M.H.; BATISTA, B.L.; DUARTE, S.M.S.; LEMOS, B. Influence of processing and roasting on the antioxidant activity of coffee (*Coffea arabica*). **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 604-610, 2007.

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

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

SCOTTI, C.T.; VERGOIGNAN, C.; FERON, G.; DURAND, A. Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* grown in solid state cultivation conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 7, p. 1-5, 2001.

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

SEITZ, L. M.; SAUER, D. B.; BURROUGHS, R.; MOHR, H. E. Ergosterol as a measure of fungal growth. **Phytopathology**, v. 69, p. 1202- 1213, 1979.

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

SHAHIDI, F. e NAZCK, M. Extration and analysis of phenolics in food review **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95-111, 2004.

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.

SINGLETON, V. L. e ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-168, 1965.

SKERGET, M.; KOTNIK, P.; HADOLIN, M.; HRAS, A. R.; SIMONIC, M.; KNEZ, Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 89, p. 191-198, 2005.

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

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

SOFOS, J.N.; BEUCHAT, L.R.; DAVIDSON, P.M., JOHNSON, E.A. Naturally occurring antimicrobials in food, an interpretive summary. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 28, p. 71-72, 1998.

SOUBRA, L.; SARKIS, D.; HILAN, C.; VERGER, P. Occurrence of total aflatoxins, ochratoxin A and deoxynivalenol in food stuffs available on the Lebanese market and their impact on dietary exposure of children and teenagers in Beirut. **Food Additives and Contamination**, v. 26, n. 2, p. 189-200, 2009.

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

SOUZA, F.T.; MARGARITES, A.C.; COLLA, L.M.; COSTA, J.A.V., BERTOLIN, T.E. Evaluation of the antioxidant potential of phycocyanin in soil and olive oils. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, n. 3 p. 275-279, 2006.

SOUZA, M. M.; OLIVEIRA, M. S.; ROCHA, M.; FURLONG, E. B. Antifungal activity evaluation in phenolic extracts from onion, rice bran, and *Chlorella phyrenoidosa* **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**, v. 35, n. 6, p. 1050-1058, 2011.

SOUZA, M. M.; RECARTE, V. M.; ROCHA, M.; CIPOLATTI, E. P.; BADIALE-FURLONG, E. Study on the extracting conditions of phenolic compounds from onion (*Allium cepa* L.). **Revista do Instituto Adolf Lutz**, v. 68, n. 2, p. 192-200, 2009.

SPARRINGA, R.A.; OWENS, J.D. Glucosamine content of tempe mould, *Rhizopus oligosporus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, p. 153-157, 1999.

SRIVASTAVA, B.; SINGH, P.; SHUKLA, R.; DUBEY, N.K. A novel combination of the essential oils of Cinnamomum camphora and Alpinia galanga in checking aflatoxin B1 production by a toxigenic strain of *Aspergillus flavus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 24, p. 693–697, 2008.

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

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

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

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

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

TANTAWY, S. T.A. Biological potential of cyanobacterial metabolites against some soil pathogenic fungi. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 9, n. 1, p. 663-666, 2011.

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.

TOMASELLI, I. **Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira (Spirulina)***. In: VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira)*. **Physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor & Francis, 1997. ISBN 0-7484-0674-3.

TOMASELLI-SCOTTI, C.; VERGOIGNAN, C.; FERON, G.; DURAND, A. Glucosamine Measurement as Indirect Method for Biomass Estimation of *Cunninghamella elegans* Grown in Solid State Cultivation Conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 7, p. 1-5, 2001.

TSIAPARA, A.V.; JAAKKOLA, M.; CHINO, I.; GRAIKOU, K.; TOLONEN, T.; VIRTANEN, V.; MOUTSATSOU, P. Bioactivity of Greek honey extracts on breast cancer (MCF-7), prostate cancer (PC-3) and endometrial cancer (Ishikawa) cells: Profile analysis of extracts. **Food Chemistry**, v. 116, p. 702-708, 2009.

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

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

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

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

VENTURINI, M.E.; BLANCO, D.; ORIA, R. In vitro antifungal activity of several antimicrobial compounds against *Penicillium expansum*. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 5, p. 834-839, 2002.

VON DER, W. D., DILLON, J.C. **Falquet J. Malnutrition: a silent massacre**. Geneve: Antenna Technology; 2000. 13p.

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

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

WANG, L.; PAN, B.; SHENG, J.; XU, J.; HU, Q. Antioxidant activity of *Spirulina platensis* extracts by supercritical carbon dioxide extraction. **Food Chemistry**, v. 105, p. 36–41, 2007.

WELKE, E. J. *et al.* Determination of Ochratoxin A in Wine by High-Performance Thin Layer Chromatography using Charged Coupled Device. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 3, p. 441-446, 2010.

WILLIAMS, J. H.; PHILLIPS, T. D.; JOLLY, P. E.; STILES, J. K.; JOLLY, C. M.; Aggarwal, D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, n. 5, p. 1106–1122, 2004.

WU, L.C.; HO, J.A.A.; SHIEH, M.C.; LU IN, W. Antioxidant and antiproliferative activities of *Spirulina* and *Chlorella* extracts. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4207-4212, 2005.

XU, G.; YE, X.; LIU, D.; MA, Y.; CHEN, J. Composition and distribution of phenolic acids in Ponkan (*Citrus poonensis* Hort. ex Tanaka) and Huyou (*Citrus paradisi* Macf. Changshanhuoyou) during maturity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 382– 389, 2008.

YASUKAWA, K.; AKIHISA, T.; KANNO, H.; KAMINAGA, T.; IZUMIDA, M.; SAKOH, T.; TAMURA, T.; TAKIDO, M. Inhibitory effects of sterols isoleted from *Chlorella vulgaris* on 12-O-tetradecanoylphobol-13acetate-Induced inflammation and tumor promotion in mouse skin. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 19, n. 4, p. 573-576,1996.

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.

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

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

ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; GOLDBECK, R.; QUEIROZ, M. I. Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanotece microscopica* Nägeli submitted to different drying conditions. **Chemical Engineering and Processing**, v. 47, p. 1311-1316, 2008.

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

ANEXO 1