



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

IMPACTO DA APLICAÇÃO DE EXTRATOS FENÓLICOS MICROALGAIS NA
CONTAMINAÇÃO POR FUNGOS DO COMPLEXO *Fusarium* E NA PRODUÇÃO DE
MICOTOXINAS EM CAMPOS DE TRIGO E MILHO
PRISCILA TESSMER SCAGLIONI

PROF^a DR^a ELIANA BADIALE FURLONG
Orientador

RIO GRANDE, RS
2017

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

IMPACTO DA APLICAÇÃO DE EXTRATOS FENÓLICOS DE MICROALGAS NA
CONTAMINAÇÃO POR FUNGOS DO COMPLEXO *Fusarium* E NA PRODUÇÃO DE
MICOTOXINAS EM CAMPOS DE TRIGO E MILHO
PRISCILA TESSMER SCAGLIONI

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

PROF^a DR^a ELIANA BADIALE FURLONG
Orientador

RIO GRANDE, RS

2017

Ficha catalográfica

S278i Scaglioni, Priscila Tessmer.
Impacto da aplicação de extratos fenólicos de microalgas na contaminação por fungos complexos *Fusarium* e na produção de micotoxinas em campos de trigo e milho / Priscila Tessmer Scaglioni. – 2017.
190 p.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2017.
Orientadora: Dr^a. Eliana Badiale Furlong.

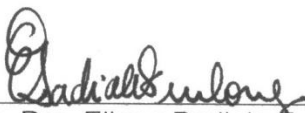
1. Antifúngico natural 2. *Fusarium* 3. *Nannochloropsis* sp.
4. *Spirulina* sp. I. Furlong, Eliana Badiale II. Título.

CDU 664

Catálogo na Fonte: Bibliotecário Me. João Paulo Borges da Silveira CRB 10/2130

APROVAÇÃO

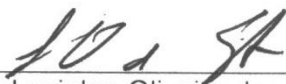
Tese defendida por Priscila Tessmer Scaglioni e aprovada em 23 de Março de 2017, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



Profa. Dra. Eliana Badiale Purlong – FURG



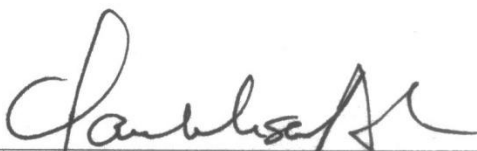
Profa. Dra. Giniani Carla Dors – UFPEL



Profa. Dra. Luciellen Oliveira dos Santos – FURG



Profa. Dra. Susana Juliano Kalil – FURG



Prof. Dr. Paulo Cesar de Abreu – FURG

A minha mãe, Vera, dedico.

AGRADECIMENTOS

Costumo dizer que tenho muita sorte pelas pessoas que cruzam na minha vida, realmente tenho muito a agradecer a todos que me mostraram caminhos, incentivaram escolhas, participaram de momentos importantes e fizeram possível a conclusão deste trabalho.

Minha mãe, Vera, por fazer da minha educação uma prioridade na vida, por acreditar em mim e ter me dado todas as oportunidades para evoluir. Minhas conquistas são pra ti!

Minha orientadora Prof. Dr. Eliana, teu conhecimento e dedicação a profissão são inquestionáveis, és uma verdadeira Professora. Além disso, também se tornou uma grande amiga, obrigada pelos conselhos, confiança, paciência e ensinamentos, levo muitas pedras grandes que aprendi com a senhora, e tenho muito orgulho de poder ter feito parte da tua história!

Grazie ai miei italiani preferiti, Reytime! Prof. Amedeo, Ale, Debby, Vale, Fede, Andrea, David, Ventu, Giulio, Francesca e Marco, sono stati molto importante nel mio periodo all'estero. Un ringraziamento speciale al mio supervisore Prof. Dr. Massimo Blandino, per avermi ricevuto tanto bene, per avere sempre l'attenzione scientifica e personale, sei un gran capo!

As minhas ics, Larissa, Mariane, Andressa e Luana, o empenho de vocês foi essencial para conclusão deste trabalho. Obrigada pela dedicação e esforço em cumprir as metas.

Aos membros da banca, obrigada por aceitarem o convite e pelas contribuições no trabalho.

A equipe do laboratório de Ecologia do Fitoplâncton e de Micro-organismos Marinhos da FURG, em especial ao Bruno, pela disponibilidade em mostrar o processo de obtenção e pelo fornecimento da biomassa de *Nannochloropsis* sp.

Ao Prof. Dr. Emerson e a Camila, pelo fornecimento das cepas de *Fusarium*.

A equipe do Centro de Microscopia Eletrônica da FURG, pelas análises realizadas.

As amigas que estiveram presentes ao longo deste período: Cris, mesmo sem o convívio diário, obrigada pelo suporte nos momentos difíceis, pelos conselhos e por escutar meus áudios infinitos no whatsapp.

Tania, minha irmã que mora longe, obrigada por se manter na minha vida, por torcer por mim e dividir comigo teus momentos mais importantes.

Karen, meu presente de 2016, obrigada por aturar minha chatice diária, tua chegada foi muito importante pra mim!

Patrícia, que segue sendo a pessoa mais prestativa que conheço! Muita saudade!

As meninas que dividiram moradia comigo neste período, Ana, Pico, Tuanny, Mari, Ludi, Dai, Karen e Dedê, obrigada pela convivência e tolerâncias do dia a dia.

A todos os integrantes do laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos da FURG, neste período muitas pessoas conviveram a maior parte dos seus dias em conjunto, isso nem sempre é fácil, então agradeço a paciência, a disponibilidade em ajudar e os momentos de descontração. Cada um de vocês teve uma participação especial na minha formação profissional e pessoal, e sou muito grata por isso.

Em especial:

Larine, obrigada por sempre se demonstrar disposta a ajudar e pelos bons momentos compartilhados.

Tai, obrigada pela paciência, trocas de ideias e bons momentos compartilhados.

As meninas que não me abandonam, Ane, Annie e Náthali, obrigada por todos os conselhos, apoio e por terem participado da minha estadia na Itália como se estivessem lá comigo!

Jesus, por ser essa pessoa tão iluminada, que me faz refletir com seus conselhos e sempre vê as coisas da melhor maneira, tu fazes falta no dia-a-dia!

Fernanda, por ser a incentivadora inicial do projeto, obrigada pela disponibilidade quando precisei e pelas ideias trocadas.

Ao trio, Bibiana, Kelly e Sabrina, a chegada de vocês fez diferença no laboratório, obrigada por serem tão especiais, cada uma ao seu modo.

Aos meninos, Keven, Maicon, Rafa e Manuel, obrigada por fazerem força por nós (hehehe), de verdade, obrigada por descomplicar o que muita mulher junto complica. Vocês me divertem!

A Cris Bret, Ana, Mi, Nara, Elisa, Carmen, Marina, Maristela e Jaque pela convivência, disponibilidade em ajudar e ideias trocadas.

*Se non credi non speri
Se non speri non ci provi
Se non ci provi non cambierà mai niente!*

(Luciano Lugabue)

*Se não acreditas não esperas
Se não esperas não tentas
Se não tentas, não mudarás nada nunca!*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	17
LISTA DE TABELAS.....	19
CAPÍTULO I.....	21
RESUMO.....	23
ABSTRACT	25
1 INTRODUÇÃO	26
2 OBJETIVOS	29
2.1 GERAL	29
2.2 ESPECÍFICOS.....	29
CAPÍTULO II	31
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	33
3.1 CONTAMINAÇÃO FÚNGICA EM CEREAIS	33
3.1.1 Trigo	34
3.1.2 Milho.....	36
3.2 COMPLEXO DO GÊNERO <i>Fusarium</i>	39
3.2.1 Tricotecenos	41
3.2.2 Fumonisinás	43
3.3 MICROALGAS.....	46
3.3.1 <i>Nannochloropsis</i> sp.....	46
3.3.2 <i>Spirulina</i> sp.	48
3.4 FUNGICIDAS E ANTIFÚNGICOS NATURAIS.....	49
CAPÍTULO III	53
ARTIGO I – EXTRATOS FENÓLICOS DE <i>Nannochloropsis</i> sp. e <i>Spirulina</i> sp.: PERFIL DE ÁCIDOS FENÓLICOS, INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES.....	55
RESUMO.....	57
1 INTRODUÇÃO	59
2 MATERIAL E MÉTODOS	60
2.1 CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS BIOMASSAS DE MICROALGAS	60
2.2 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO FENÓLICO NOS EXTRATOS DE MICROALGAS.....	61
2.2.1 Extração	61
2.2.2 Quantificação.....	62
2.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E INIBIÇÃO ENZIMÁTICA DOS EXTRATOS DE MICROALGAS.....	63
2.3.1 Inativação do radical catiônico ABTS ⁺	64

2.3.2 Inibição do radical livre DPPH	64
2.3.3 Inibição da atividade da peroxidase.....	65
2.3.4 Inibição da atividade de α -amilase.....	65
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	66
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
3.1 COMPOSIÇÃO DAS BIOMASSAS.....	66
3.1.1 Macro-componentes	67
3.1.2 Componentes fenólicos	69
3.2 ATIVIDADE INIBIDORA DE RADICAIS LIVRES E DE ENZIMA OXIDO-REDUTASE	73
3.3 INIBIÇÃO DE α -AMILASE	76
3.4 CORRELAÇÃO ENTRE OS EFEITOS INIBIDORES	77
4 CONCLUSÃO	79
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
ARTIGO II - APLICAÇÃO DE EXTRATOS DE <i>Nannochloropsis</i> sp. E <i>Spirulina</i> sp. NA INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE ISOLADOS DO COMPLEXO <i>Fusarium graminearum</i>.....	85
RESUMO	87
1 INTRODUÇÃO	89
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	90
2.1 ISOLADOS FÚNGICOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	90
2.2 PRODUÇÃO DAS BIOMASSAS DE MICROALGAS	91
2.3 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS.....	91
2.4 DETERMINAÇÃO DOS CAROTENOIDES	91
2.5 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS FENÓLICOS E CAROTENOIDES	92
2.6 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE GLICOSAMINA E ERGOSTEROL	94
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	94
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
3.1 COMPOSIÇÃO DOS EXTRATOS FENÓLICOS E DE CAROTENOIDES DAS BIOMASSAS	95
3.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	97
4 CONCLUSÃO	104
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
ARTIGO III - APLICAÇÃO DE ANTIFÚNGICOS NATURAIS E SEU IMPACTO NA QUALIDADE DOS GRÃOS, OCORRÊNCIA DE DOENÇAS FÚNGICAS E PRODUÇÃO DE TRICOTECENOS EM CAMPOS DE TRIGO NO NOROESTE DA ITÁLIA	109
RESUMO	111
1 INTRODUÇÃO	113

2 MATERIAIS E MÉTODOS	115
2.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS FENÓLICOS DE MICROALGAS.....	115
2.2 CAPACIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS DE MICROALGAS CONTRA CEPA DE <i>Fusarium graminearum</i> (CML 3607)	115
2.3 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE ERGOSTEROL	116
2.4 ATIVIDADE DA α -AMILASE	116
2.5 APLICAÇÃO DOS EXTRATOS DE MICROALGAS EM CULTURAS DE TRIGO ..	116
2.6 SINTOMAS DE FUSARIOSE (GIBERELA)	117
2.7 AVALIAÇÃO DA SEPTORIOSE	118
2.8 AVALIAÇÃO DO VERDOR DA FOLHA BANDEIRA	118
2.9 PARÂMETROS PRODUTIVOS E DE COMPOSIÇÃO DO GRÃO DE TRIGO	119
2.10 DETERMINAÇÃO DE TRICOTECENOS	119
2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	121
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	121
3.1 EFEITO DOS EXTRATOS DE MICROALGAS NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA FÚNGICA <i>in vitro</i>	121
3.1.1 Formação de halo micelial.....	121
3.1.2 Produção de ergosterol	124
3.1.3 Inibição de α -amilase pelos extratos de microalgas	124
3.1.4 Efeito dos extratos de microalgas na produção de micotoxinas em estudo <i>in vitro</i>	126
3.2 EFEITO DOS EXTRATOS DE MICROALGAS EM EXPERIMENTO <i>in vivo</i>	127
3.2.1 Qualidade do grão	127
3.2.2 Parâmetros indicativos da contaminação no campo	128
3.3 ESTIMATIVA DA DOSE RECOMENDADA	132
4 CONCLUSÃO	133
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134
ARTIGO IV - IMPACTO DA APLICAÇÃO DE ANTIFÚNGICOS DE MICROALGAS NA PRODUÇÃO DE FUMONISINAS EM MILHO CULTIVADO NO NOROESTE DA ITÁLIA	139
RESUMO	140
1 INTRODUÇÃO	143
2 MATERIAL E MÉTODOS	144
2.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS FENÓLICOS DE MICROALGAS.....	144
2.2 CAPACIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS DE MICROALGAS <i>in vitro</i> CONTRA CEPA DE <i>Fusarium fujikuroi</i>	144
2.3 ATIVIDADE DA α -AMILASE	145
2.4 APLICAÇÃO DOS EXTRATOS DE MICROALGAS NO CULTIVO DE MILHO	145

2.5 BROCA DO COLMO (<i>Ostrinia nubilalis</i>) E PRESENÇA FÚNGICA	145
2.6 PARÂMETROS PRODUTIVOS E DE COMPOSIÇÃO DO GRÃO DE MILHO	146
2.7 DETERMINAÇÃO DE FUMONISINAS B ₁ E B ₂ (FB ₁ E FB ₂)	147
2.8 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE ERGOSTEROL.....	149
2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	149
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	149
3.1. EFEITO DA APLICAÇÃO DOS EXTRATOS NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA PELO FUNGO	149
3.2 EFEITO DOS EXTRATOS NATURAIS E FUNGICIDA COMERCIAL NA CONCENTRAÇÃO DE ERGOSTEROL E NA ATIVIDADE DA α -AMILASE	151
3.3 EFEITO DA APLICAÇÃO <i>in vitro</i> DE EXTRATOS DE MICROALGAS E FUNGICIDA COMERCIAL NA PRODUÇÃO DE FUMONISINA B ₁	153
3.4 APLICAÇÕES DOS EXTRATOS DE MICROALGAS EM CAMPO	154
3.5 CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS E ERGOSTEROL NOS GRÃOS DE MILHO PROVENIENTES DOS CAMPOS	157
3.6 ESTIMATIVA DA DOSE RECOMENDADA	158
4 CONCLUSÃO	159
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	159
CAPÍTULO IV	163
CONCLUSÃO GERAL	165
CAPÍTULO V	167
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	168
ANEXO 1 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA PEROXIDASE	189
ANEXO 2 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA α-AMILASE	191

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 - Ciclo da doença causada por <i>Fusarium graminearum</i> no trigo.....	35
Figura 2 - Ciclo da fusariose em milho com diferentes vias de infecção, destacando-se a infecção pelos grãos, estigma e injúria por insetos.	38
Figura 3 - Estruturas reprodutivas do gênero <i>Fusarium</i>	40
Figura 4 - Estrutura básica dos tricotecenos.....	42
Figura 5 - Estrutura química das principais fumonisinas.	44

CAPÍTULO III

ARTIGO I - EXTRATOS FENÓLICOS DE *Nannochloropsis* sp. E *Spirulina* sp.: PERFIL DE ÁCIDOS FENÓLICOS, INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES

Figura 1 - Cromatograma (HPLC-UV) dos ácidos fenólicos solúveis em metanol: padrões sintéticos (a); (b) <i>Spirulina</i> sp. (c) <i>Nannochloropsis</i> sp. 1. Ácido gálico; 2. Protocatecóico; 3. Clorogênico; 4. Hidroxibenzóico; 5. Caféico; 6. Siríngico; 7. Vanilina; 8. Cumárico; 9. Ferúlico.....	71
Figura 2 - Exemplos de cromatogramas (LC-ESI-MS/MS) dos ácidos fenólicos solúveis em metanol: padrões (a); (b) <i>Spirulina</i> sp. (c) <i>Nannochloropsis</i> sp.....	72
Figura 3 - Comparação da inibição específica média resultante da aplicação dos extratos fenólicos (% min ⁻¹ µg ⁻¹) nos diferentes experimentos.	78
Figura 4 - Análise de componentes principais dos extratos naturais e misturas sintéticas de <i>Spirulina</i> sp. e <i>Nannochloropsis</i> sp. relacionando os ácidos fenólicos e os métodos de atividade antioxidante e de inibição enzimática.	78

ARTIGO II - APLICAÇÃO DE EXTRATOS DE *Nannochloropsis* sp. E *Spirulina* sp. NA INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE ISOLADOS DO COMPLEXO *Fusarium graminearum*

Figura 1 - Curvas do crescimento micelial das cepas do complexo <i>Fusarium graminearum</i> , isolados de cevada (<i>F. meridionale</i>), trigo (<i>F. graminearum</i>) e arroz (<i>F. asiaticum</i>), tratadas com diferentes extratos de microalgas (carotenoides, compostos fenólicos ligados, solúveis em etanol ou metanol).	98
Figura 2 - Curvas de crescimento micelial do complexo <i>Fusarium graminearum</i> isolados de arroz (<i>F. asiaticum</i>), trigo (<i>F. graminearum</i>) e cevada (<i>F. meridionale</i>) tratados com extratos de microalgas naturais e misturas sintéticas.	100
Figura 3 - Produção de ergosterol pelo complexo de <i>Fusarium graminearum</i> , isolado de arroz (<i>F. asiaticum</i>), trigo (<i>F. graminearum</i>) e cevada (<i>F. meridionale</i>), tratados com extratos fenólicos naturais de <i>Spirulina</i> sp. ou <i>Nannochloropsis</i> sp. e misturas sintéticas dos fenólicos presentes nas microalgas.	103
Figura 4 - Correlação da biomassa fúngica com o conteúdo de ergosterol ao longo do tempo.	103

ARTIGO III - APLICAÇÃO DE ANTIFÚNGICOS NATURAIS E SEU IMPACTO NA QUALIDADE DOS GRÃOS, OCORRÊNCIA DE DOENÇAS FÚNGICAS E PRODUÇÃO DE TRICOTECENOS EM CAMPOS DE TRIGO NO NOROESTE DA ITÁLIA

Figura 1 - Desenvolvimento do halo da cepa CML 3607 do complexo <i>F. graminearum</i> submetida a diferentes tratamentos.....	122
--	-----

Figura 2 - Produção de biomassa fúngica pela cepa CML 3607 do complexo <i>F. graminearum</i> após 24, 96 e 168 h incubadas com ágar batata dextrose e grãos de trigo na presença de água (controle), extrato fenólico de <i>Nannochloropsis</i> sp., extrato fenólico de <i>Spirulina</i> sp. e tebuconazol.	122
Figura 3 - Morfologia da cepa CML 3607 do complexo <i>F. graminearum</i> após inoculação por 168 h com ágar batata dextrose na presença de água (controle), extrato fenólicos de <i>Nannochloropsis</i> sp., <i>Spirulina</i> sp. e tebuconazol.	123
Figura 4 - Atividade específica da α -amilase ($\%_{\text{inibição}} \text{ min}^{-1} \mu\text{g}_{\text{princípio ativo}}^{-1}$) nos diferentes tratamentos do cultivo <i>in vitro</i> da cepa CML 3607 do complexo <i>F. graminearum</i>	125

ARTIGO IV - IMPACTO DA APLICAÇÃO DE ANTIFÚNGICOS DE MICROALGAS NA PRODUÇÃO DE FUMONISINAS EM MILHO CULTIVADO NO NOROESTE DA ITÁLIA

Figura 1 - Cepa de <i>Fusarium fujikuroi</i> visualizada no microscópio.	144
Figura 2 - Desenvolvimento radial dos discos de micélio da cepa de <i>Fusarium fujikuroi</i> submetida a diferentes tratamentos.	150
Figura 3 - Atividade específica da α -amilase ($\%_{\text{inibição}} \text{ min}^{-1} \mu\text{g}_{\text{princípio ativo}}^{-1}$) nos diferentes tratamentos do cultivo <i>in vitro</i> da cepa de <i>Fusarium fujikuroi</i>	153

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1 - Limites máximos toleráveis de deoxinivalenol e fumonisinas B₁ e B₂ em diferentes alimentos no Brasil e na União Europeia. 45

CAPÍTULO III

ARTIGO I - EXTRATOS FENÓLICOS DE *Nannochloropsis* sp. E *Spirulina* sp.: PERFIL DE ÁCIDOS FENÓLICOS, INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES

Tabela 1 - Composição proximal [% (CV%)] das biomassas de microalgas. 67

Tabela 2 - Composição de ácidos graxos (%) das biomassas de *Nannochloropsis* sp. e *Spirulina* sp. 68

Tabela 3 - Parâmetros de validação dos métodos espectrofotométrico e cromatográfico usados para determinar os compostos e ácidos fenólicos. 69

Tabela 4 - Composição de ácidos fenólicos [$\mu\text{g g}^{-1}$ (CV%)] presentes em *Spirulina* sp. e *Nannochloropsis* sp. e conteúdo de compostos fenólicos contidos nos extratos alcoólicos. ... 73

Tabela 5 - Inibição específica do radical ABTS⁺ [% $\text{min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}_{\text{fenol}}$ (CV%)] do radical DPPH [% $\text{min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}_{\text{fenol}}$ (CV%)] e das atividades enzimáticas da peroxidase [% $\text{min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}_{\text{fenol}}$ (CV%)] e da α -amilase [% $\text{min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}_{\text{fenol}}$ (CV%)] por extratos fenólicos de microalgas naturais e misturas sintéticas. 74

ARTIGO II - APLICAÇÃO DE EXTRATOS DE *Nannochloropsis* sp. E *Spirulina* sp. NA INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE ISOLADOS DO COMPLEXO *Fusarium graminearum*

Tabela 1 - Taxa de crescimento micelial média (cm dia^{-1}) até o sexto dia de crescimento, para experimento fatorial de três vias que testa o efeito de duas microalgas, quatro formulações diferentes e três membros do complexo de espécies de *Fusarium graminearum* que causam doenças em culturas de cereais. 99

Tabela 2 - Metade da concentração eficaz máxima (EC_{50}) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos extratos fenólicos solúveis em metanol de *Spirulina* sp. e *Nannochloropsis* sp. depois de sete dias contra três isolados do complexo *F. graminearum* que causam doenças em culturas de cereais. 99

Tabela 3 - Taxa de crescimento micelial média (cm dia^{-1}) até o sexto dia de crescimento, para experimento fatorial de três vias que testa o efeito dos extratos de duas microalgas, duas formulações diferentes e três isolados do complexo *Fusarium graminearum* que causam doenças em culturas de cereais. 101

Tabela 4 - Redução (%) de ergosterol e glicosamina em isolados do complexo *Fusarium graminearum* cultivados por 168 h. 102

ARTIGO III - APLICAÇÃO DE ANTIFÚNGICOS NATURAIS E SEU IMPACTO NA QUALIDADE DOS GRÃOS, OCORRÊNCIA DE DOENÇAS FÚNGICAS E PRODUÇÃO DE TRICOTECENOS EM CAMPOS DE TRIGO NO NOROESTE DA ITÁLIA

Tabela 1 - Tratamentos realizados no cultivo de trigo duro. 117

Tabela 2 - Tratamentos realizados no cultivo de trigo comum. 118

Tabela 3 - Redução (%) da atividade enzimática da α -amilase ($\mu\text{g}_{\text{amido hidrolisado min}^{-1}}$) e da concentração de ergosterol produzido em relação ao tratamento controle. 125

Tabela 4 - Efeito dos extratos fenólicos de microalgas e do fungicida comercial na produção dos tricotecenos nivalenol, deoxinivalenol e seus acetilados (determinados por HPLC-UV) pela cepa CML 3607 do complexo *F. graminearum* após 168 h de cultivo. 127

Tabela 5 - Influência dos tratamentos realizados na cultura de trigo no campo de Carmagnola nos parâmetros furariose, septoriose, produtividade e concentração de deoxinivalenol.	129
Tabela 6 - Resultados dos tratamentos realizados na cultura de trigo no campo de Buriasco no ano de 2015.	131
Tabela 7 - Resultados dos tratamentos realizados na cultura de trigo no campo de Buriasco no ano de 2016.	132
Tabela 8 - Concentração de ácidos fenólicos [$\mu\text{g g}^{-1}$ (CV%)] encontrada nos grãos de trigo cultivados sob diferentes tratamentos.	133
Tabela 9 - Dados demonstrativos da eficiência da dose dos extratos fenólicos de microalgas aplicados em experimentos <i>in vitro</i> e em campo.	134

ARTIGO IV - IMPACTO DA APLICAÇÃO DE ANTIFÚNGICOS DE MICROALGAS NA PRODUÇÃO DE FUMONISINAS EM MILHO CULTIVADO NO NOROESTE DA ITÁLIA

Tabela 1 - Tratamentos utilizados para o milho no campo de Micoprincem.	146
Tabela 2 - Tratamentos utilizados para o milho no campo de Cordero.	147
Tabela 3 - Redução (%) da atividade enzimática da α -amilase e da concentração de ergosterol produzido em relação ao tratamento controle.	152
Tabela 4 - Concentração de fumonisina B ₁ [$\mu\text{g kg}^{-1}$ (CV%)] produzida pela cepa de <i>Fusarium fujikuroi</i> submetida a diferentes tratamentos.	154
Tabela 5 - Resultados dos tratamentos realizados na cultura de milho no campo de Micoprincem.	155
Tabela 6 - Resultados dos tratamentos realizados na cultura de milho no campo de Cordero.	156
Tabela 7 - Concentração de ácidos fenólicos nos grãos de milho cultivados sob diferentes tratamentos.	158
Tabela 8 - Dados demonstrativos da eficiência da dose dos extratos fenólicos de microalgas aplicadas em experimentos <i>in vitro</i> e em campo.	159

ANEXO 1 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA PEROXIDASE

Tabela 1 - Procedimento para determinação da atividade enzimática da peroxidase.	189
--	-----

ANEXO 2 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA α -AMILASE

Tabela 1 - Procedimento para determinação da atividade enzimática da α -amilase.	191
---	-----

CAPÍTULO I

RESUMO

A utilização de compostos com atividade antifúngica e antimicotoxigênica presentes em fontes naturais mostra-se promissora, tendo em vista que a aplicação de fungicidas sintéticos muitas vezes está relacionada com danos tóxicos em humanos, animais e no meio ambiente. Os principais objetivos deste estudo foram avaliar a capacidade antioxidante e antifúngica de extratos fenólicos de microalgas e estudar os seus mecanismos de ação, descrevendo o impacto dos extratos em campos de trigo e milho. Primeiramente, as biomassas das microalgas *Nannochloropsis* sp. e *Spirulina* sp. foram caracterizadas quanto a sua composição química, ácidos graxos, compostos fenólicos, carotenoides e perfil de ácidos fenólicos. A partir desta composição, o estudo foi desenvolvido de forma a determinar: a) o poder inibitório de processos oxidativos e enzimáticos (α -amilase e peroxidase) pelos extratos fenólicos; b) o potencial antifúngico dos extratos de microalgas contendo os ácidos fenólicos, avaliando, *in vitro*, cepas de *Fusarium* isoladas de cereais através da determinação de halo micelial, ergosterol, glicosamina, tricotecenos (deoxinivalenol, nivalenol e acetilados) e fumonisina B₁; c) o efeito de extratos fenólicos de microalgas e tebuconazol nas doenças fúngicas em campos de trigo na Itália; d) o efeito dos extratos fenólicos sobre o desenvolvimento e produção de fumonisinas em campos de milho cultivados no Noroeste da Itália. Os extratos fenólicos foram capazes de inibir a atividade das enzimas α -amilase e peroxidase em níveis de até 0,07% min⁻¹ μ g⁻¹ e 0,4% min⁻¹ μ g⁻¹, respectivamente. Além de apresentarem atividade antioxidante na captura dos radicais livres ABTS e DPPH. Quando aplicados contra cepas pertencentes ao complexo de *Fusarium graminearum*, os extratos de microalgas demonstraram eficiência, não necessitando de etapas de purificação. A produção de ergosterol foi altamente associada com o desenvolvimento do micélio ao longo do tempo ($\rho = 0,92$ para *F. graminearum* e *F. meridionale*). Em experimento utilizando grãos de trigo como substrato para o isolado fúngico os extratos fenólicos de *Nannochloropsis* sp. (45,2 μ g mL⁻¹) e de *Spirulina* sp. (40 μ g mL⁻¹) foram aplicados nas doses de 64 mL m⁻² e inibiram em média, respectivamente, 82 e 68% a produção de tricotecenos, enquanto que a aplicação do tebuconazol favoreceu a produção de micotoxinas. No campo, utilizando doses de 12 mL m⁻² dos extratos de microalgas, houve inibição de 38% e 55% de deoxinivalenol pelos extratos de *Nannochloropsis* sp. e *Spirulina* sp., respectivamente. Em grãos de milho houve inibição de fumonisina B₁ com os extratos naturais (95%) e tebuconazol (53%). Nos experimentos em campo de milho, os extratos aplicados em conjunto com inseticida na fase de florescimento da planta promoveram redução superior a 90% e 82% para as fumonisina B₁ e B₂, respectivamente. As microalgas são fontes promissoras de compostos com atividade antifúngica e por se tratar de uma matéria-prima natural esta aplicação é uma alternativa ao uso de fungicidas que geram resíduos ao meio ambiente e desencadeiam efeitos tóxicos. Investimentos em cultivo de biomassa em condições que estimulem a produção de ácidos fenólicos e processos de extração mais eficiente são interessantes para aplicação dos extratos destas microalgas em cultivo de trigo e milho, pois não afetam o emprego de outros componentes da matriz para os fins já consolidados.

Palavras-chave: Antifúngico natural. *Fusarium*. *Nannochloropsis* sp. *Spirulina* sp.

ABSTRACT

IMPACT OF THE APPLICATION OF PHENOLIC EXTRACTS OF MICROALGAE IN THE COMPLEX *Fusarium* CONTAMINATION AND THE PRODUCTION OF MYCOTOXINS IN WHEAT AND CORN FIELDS

The use of compounds with antifungal and antimycotoxigenic activity present in natural sources is promising, since the application of synthetic fungicides is often related to toxic damages in humans, animals and the environment. The main objectives of this study were to evaluate the antioxidant and antifungal capacity of phenolic extracts of microalgae and to study their mechanisms of action, describing the impact of the extracts in wheat and corn fields. First, the biomass of the microalgae *Nannochloropsis* sp. and *Spirulina* sp. were characterized as to their chemical composition, fatty acids, phenolic compounds, carotenoids and profile of phenolic acids. From this composition, the study was developed in order to determine: a) the inhibitory power of oxidative and enzymatic processes (α -amylase and peroxidase) by phenolic extracts; b) the antifungal potential of microalgae extracts containing phenolic acids, evaluating, *in vitro*, *Fusarium* strains isolated from cereals through the determination of mycelial halo, ergosterol, glucosamine, trichothecenes (deoxynivalenol, nivalenol and acetylates) and fumonisin B₁; c) the effect of phenolic extracts of microalgae and tebuconazole on fungal diseases in wheat fields in Italy; d) the effect of phenolic extracts on the development and production of fumonisins in corn fields grown in Northwest Italy. Phenolic extracts were able to inhibit the activity of α -amylase and peroxidase enzymes at levels up to $0.07\% \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ and $0.4\% \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$, respectively. In addition to presenting antioxidant activity in the capture of free radicals ABTS and DPPH. When applied to strains belonging to the *Fusarium graminearum* complex, microalgae extracts demonstrated efficiency, requiring no purification steps. The production of ergosterol was highly associated with the development of the mycelium over time ($\rho = 0.92$ for *F. graminearum* and *F. meridionale*). In an experiment using wheat grains as a substrate for the fungal strain, the phenolic extracts of *Nannochloropsis* sp. ($45.2 \mu\text{g mL}^{-1}$) and *Spirulina* sp. ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$) were applied at doses of 64 mL m^{-2} and inhibited, on average, 82 and 68% the production of trichothecenes, whereas the application of tebuconazole favored the production of mycotoxins. In the field, using doses of 12 mL m^{-2} of the extracts of microalgae, there was inhibition of 38% and 55% of deoxynivalenol by extracts of *Nannochloropsis* sp. and *Spirulina* sp., respectively. In corn grains there was inhibition of fumonisin B₁ with natural extracts (95%) and tebuconazole (53%). In the corn field experiments, the extracts applied together with insecticide in the flowering stage of the plant promoted a reduction of more than 90% and 82% for fumonisin B₁ and B₂, respectively. Microalgae are promising sources of compounds with antifungal activity and because it is a natural raw material this application is an alternative to the use of fungicides that generate waste to the environment and trigger toxic effects. Investments in biomass cultivation under conditions that stimulate the production of phenolic acids and more efficient extraction processes are interesting for the application of the extracts of these microalgae in wheat and corn cultivation, since they do not affect the use of other components of the matrix for the purposes already consolidated.

Keywords: natural antifungal. *Fusarium*. *Nannochloropsis* sp. *Spirulina* sp.

1 INTRODUÇÃO

Os cereais utilizados como base alimentar em diversas regiões do mundo apresentam composição química e propriedades tecnológicas que os tornam susceptíveis ao ataque de fungos e insetos predadores, dentre outras pragas, sendo responsáveis por grandes prejuízos para a agricultura. A contaminação dos alimentos por fungos representa um perigo à saúde pública, tendo em vista que esses micro-organismos, além de diminuir a disponibilidade de nutrientes, alteram as características sensoriais e podem produzir substâncias tóxicas (FERRY et al., 2004).

Dentre as pragas que atacam os cereais, o gênero fúngico *Fusarium*, que pode ser encontrado habitando o solo nas mais diversas regiões geográficas do mundo, se destaca pela frequência de ocorrência. Especialmente em locais de climas tropicais e subtropicais, esse gênero fúngico é capaz de sobreviver por longos períodos no solo pela formação de estruturas chamadas clamidósporos. Também podem colonizar ramos, folhas, inflorescências e frutos através de seus conídios que são disseminados pelo ar ou pela água, o que lhe confere grande possibilidade de infectar e destruir importantes culturas, como milho, trigo, arroz e outros cereais (STAKHEEV et al., 2011).

Para combater a micota são utilizados defensivos agrícolas denominados fungicidas, cuja aplicação previne 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 pelo efeito estressor, ou por sua presença residual em matrizes alimentares (EL-NAGERABI et al., 2012; TIAN et al., 2012).

Os compostos antifúngicos de ocorrência natural surgem como alternativa promissora para inibição fúngica e manifestação do potencial toxigênico, uma vez que seus mecanismos de ação são mais específicos que os dos compostos sintéticos. Os compostos fenólicos, proteínas, óleos essenciais, entre outros podem atuar na inibição da produção de componentes da parede celular (glicosamina), da membrana celular (ergosterol) ou inibindo a ação de enzimas que auxiliam na obtenção de nutrientes, todas estas situações tornam o micro-organismo inviável (OLIVEIRA; BADIALE-FURLONG, 2008; PAGNUSSATT et al., 2014; SOUZA et al., 2011).

Outro fato importante é que a utilização de substâncias de origem vegetal e microbiana, para prevenir a contaminação, torna o alimento mais atrativo ao consumidor pela

inocuidade, mesmo quando empregadas em concentrações relativamente elevadas. Além dos benefícios proporcionados à saúde, visto que os compostos fenólicos, alcalóides, terpenos e proteínas também podem resultar em atividade funcional (HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2016; SOUZA et al., 2011; TIAN et al., 2012).

Uma alternativa interessante para a aplicação de soluções menos danosas aos seres vivos e ao ambiente vem da biotecnologia marinha, que tem como objetivo desenvolver métodos para a produção de produtos originados de micro-organismos marinhos, os quais podem contribuir para a saúde humana, para a indústria de alimentos e para a produção de energia (WIJFFELS, 2007). Das centenas de milhares de espécies de microalgas que se acredita existir, somente algumas mil cepas são mantidas em coleções pelo mundo e apenas algumas têm sido estudadas pelo seu potencial biotecnológico (OLAIZOLA, 2003), além disso, a ação fungicida de seus componentes tem sido pouco pesquisada.

Estudos anteriores demonstraram a ação antifúngica de compostos extraídos de *Chlorella* sp. e *Spirulina platensis* contra culturas de *Aspergillus flavus* (SOUZA et al., 2011) e da *Spirulina* sp. contra culturas de *Fusarium graminearum* (PAGNUSSATT et al., 2014, 2016). Além disso, outras bioatividades foram conferidas a diferentes gêneros de microalgas, como: atividade citotóxica da *Corallina officinalis* contra células cancerígenas (EL-KASSAS; EL-SHEEKH, 2014); atividade antioxidante das microalgas *Dunalliella* sp., *Tetraselmis* sp. e *Nannochloropsis gaditana* (MAADANE et al., 2015; MILLAO; UQUICHE, 2016); e atividade antimicrobiana da *Arthrospira plantensis* contra bactérias (ESQUIVEL-HERNÁNDEZ, 2017). Apesar da atividade antifúngica comprovada da *S. platensis*, ainda são necessários mais estudos direcionados para obter formas eficientes para aplicação dos seus compostos em culturas de cereais e para verificar sua capacidade inibitória em condições ambientais reais. Além disso, a investigação do potencial antifúngico de outras microalgas que exigem condição de cultivo distinta das já estudadas se torna interessante para ampliar as possibilidades de uso para estas fontes de compostos bioativos. Neste contexto, encontra-se a microalga marinha *Nannochloropsis* sp., que apresenta vantagem de elevado rendimento em biomassa seca e cuja composição e propriedades até hoje descritas (CUSTÓDIO et al., 2012; MILLAO; UQUICHE, 2016) sugerem a possibilidade de aplicá-la como antifúngico natural, visto que sobrevive em condições extremamente adversas.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Explorar o potencial antifúngico e antimicotoxigênico de compostos de microalgas para mitigar o impacto da contaminação de trigo e milho por fungos do complexo *Fusarium*.

2.2 ESPECÍFICOS

Verificar o poder inibitório de processos oxidativos e enzimáticos pelos extratos fenólicos de microalgas.

Identificar os mecanismos de ação dos extratos de microalgas sobre espécies de *Fusarium* isoladas de cereais.

Determinar as concentrações mínimas dos extratos para inibir a produção de biomassa fúngica e toxinas de *Fusarium*.

Descrever o impacto da aplicação de extratos de microalgas em campos de trigo e milho no que se refere à qualidade dos grãos, ocorrência de doenças fúngicas e micotoxinas.

CAPÍTULO II

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CONTAMINAÇÃO FÚNGICA EM CEREAIS

Os grãos são ricos em componentes nutricionais que se localizam principalmente no endosperma. No entanto nas paredes externas, que são constituídas basicamente por celulose, hemicelulose e lignina, é onde se encontra grande parte da comunidade microbiana contaminante, inclusive as espécies patogênicas. Esta microbiota se instala em diferentes etapas da evolução biológica do grão, ou seja, do campo ao armazenamento (OLKKU et al., 2005) e tende a se alterar conforme a disponibilidade de nutrientes e condições ambientais.

Os principais componentes da microbiota dos grãos são os fungos, que ocorrem em diversas condições bióticas e abióticas e que para obter nutrientes utilizam enzimas exocelulares que degradam o grão e diminuem as suas qualidades nutricionais e tecnológicas. A perda causada pela micota não se refere apenas aos danos na qualidade e quantidade de grãos, mas também na produção de metabólitos tóxicos: as micotoxinas, quando ocorre a presença de espécies toxigênicas (ATHIÉ et al., 1998).

Os fungos mais importantes em relação à qualidade da semente são os pertencentes aos gêneros *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*, entre outros. Apesar do conhecimento da toxicidade de certos fungos há muitos séculos, somente por volta de 1850 foi considerada a relação entre a ingestão de centeio infectado pelo fungo *Claviceps purpurea* com características clínicas do ergotismo. A partir de então passou-se a estudar o risco a saúde humana e animal associada a ingestão de metabólitos tóxicos produzidos por fungos. Posteriormente, foram identificadas outras micotoxicoses que afetavam os seres humanos, tais como a síndrome relacionada ao consumo de pão contaminado por *Fusarium graminearum*, a chamada estaquibotriotoxicose humana, e a aleucia tóxica alimentar (ATA), ocasionadas pelo consumo de cereais de inverno infectados por *Fusarium poae* e *Fusarium sporotrichioides* (DOYLE, 1997).

No início do século XIX, uma doença associada ao consumo de arroz foi relatada no Japão. Em 1944 no Marrocos, foram registrados numerosos casos de câncer hepático em porcos alimentados com farelos de torta de amendoim. A suspeita recaiu sobre as tortas que poderiam veicular toxinas cancerígenas. A demonstração de propriedades hepatotóxicas e hepatocarcinogênicas de algumas linhagens de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, no início da década de 1960, seguida pela elucidação da estrutura de seus metabólitos tóxicos, as

aflatoxinas, deu novo enfoque e prioridade para a pesquisa sobre micotoxinas. O que motivou o aprofundamento dos estudos que levaram a identificação das aflatoxinas foi a mortalidade devastadora de perus em granjas na Inglaterra, que ingeriram aflatoxinas por meio de torta de amendoim de origem brasileira contaminada com *A. parasiticus* (ALLCROFT; CARNAGHAN, 1962). A partir daí ficou consolidado o estudo e o estabelecimento de estratégias para mitigar os problemas na saúde humana e animal decorrentes da exposição a estes contaminantes.

3.1.1 Trigo

O trigo é o segundo cereal mais consumido no mundo perdendo apenas para o arroz. Sua produção mundial é cerca de 600 milhões de toneladas por ano, e aproximadamente 75% da sua produção é convertida em farinha (FAO, 2016), que por sua vez, é destinada principalmente para produtos de panificação (ABIP, 2016). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção nacional de trigo no Brasil em 2016 foi estimada em 6,4 milhões de toneladas, 16,5% maior que a safra colhida em 2015.

O trigo é um cereal fasciculado pertencente à família *Poaceae* e ao gênero *Triticum*, possuindo diversas espécies (POSNER, 2000). Ele foi o primeiro produto agrícola a ser cultivado e utilizado no processamento de alimentos. A qualidade do grão de trigo pode ser definida como resultado da interação que a cultura sofre no campo, envolvendo as condições de solo, do clima, da incidência de pragas e moléstias, manejo da cultura, da cultivar, bem como das operações de colheita e secagem, armazenamento, moagem e do uso industrial a ser dado à farinha (HOSENEY, 1991).

Embora as variedades deste cereal sejam cultivadas em muitas regiões do mundo, os locais de 30 a 60° de latitude Norte e 27 a 40° de latitude Sul são os mais produtivos. As culturas podem se adaptar a diversas condições de clima e solo; se cultivado no inverno denomina-se trigo de inverno ou na primavera, trigo de primavera, sendo que a manipulação genética resulta em aumento da produtividade, resistência ao ataque de patógenos e propriedades tecnológicas distintas (MÁTUS-CÁDIZ et al., 2003).

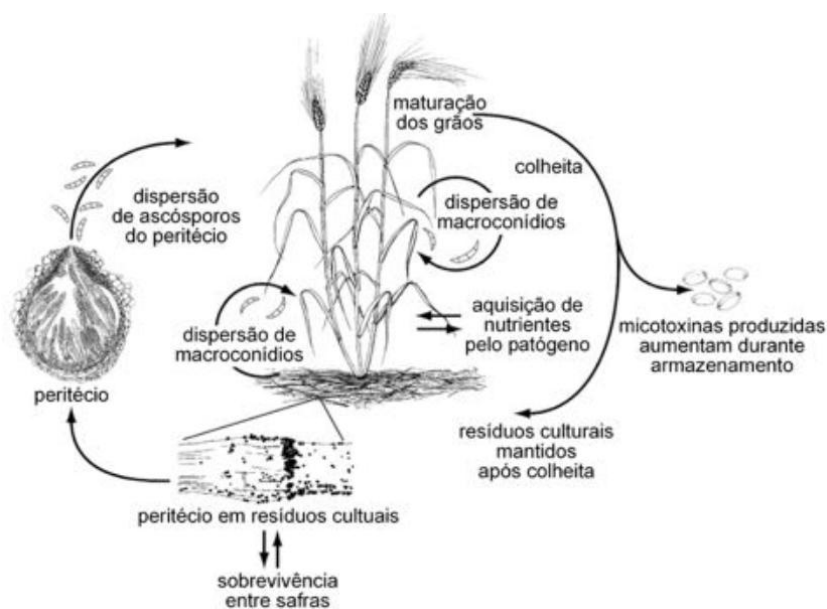
No Brasil, o trigo introduzido pelos colonizadores europeus, mostrou dificuldades de adaptação, que limitavam a estabilidade e a confiabilidade dos rendimentos. Com a introdução dos programas de melhoramento genético, foi possível superar essas limitações, seja pela seleção de variedades genéticas superiores, ou por práticas culturais mais adequadas

que modificam o ambiente para melhor adequação da planta, de forma a garantir sua alta produtividade (SOUZA et al., 2004).

A incidência de *F. graminearum* em grãos de trigo altera a composição do grão, aumentando em geral, o nível de carboidratos solúveis em água, assim como a quantidade de ácidos graxos livres, decorrente da ação das enzimas exocelulares produzidas pelo micro-organismo. O crescimento de micélio de *F. graminearum* impede o transporte de nutrientes para o endosperma em desenvolvimento e reduz significativamente a produtividade, resultando na diminuição do número e na redução da massa total de grãos. Além disso, a contaminação fúngica aumenta a degradação de amido devido à presença de enzimas como a α -amilase (MCMULLEN; JONES; GALLENBERG, 1997).

Vários trabalhos demonstraram que a principal espécie fúngica encontrada em trigo foi o *Fusarium graminearum*, que produziu maiores quantidades da micotoxina deoxinivalenol (DON) (BADIALE-FURLONG et al., 1995; BLANDINO et al., 2012; FERNANDEZ-PINTO et al., 2008; PAGNUSSATT et al., 2014; SCARPINO et al., 2015). Como forma de atenuar ou até mesmo eliminar esse tipo de contaminação, busca-se a utilização de defensivos agrícolas que ajam diretamente no contaminante e preservem as características originais da planta. Contudo, considerando o transporte de inóculo entre os diferentes locais (Figura 1) muitas vezes o manejo de resíduos na propriedade pode não ser suficiente para o controle efetivo da incidência fúngica.

Figura 1 - Ciclo da doença causada por *Fusarium graminearum* no trigo.



Fonte: ASTOLFI (2010).

Além da aplicação de defensivos, também se buscam alternativas na forma de cultivo dos cereais. O preparo do solo, denominado aração, revolve a terra com o objetivo de descompactá-la e viabilizar o melhor desenvolvimento das raízes da planta. Esta técnica reduz mais de 90% a quantidade de resíduos de colheitas anteriores, tanto na superfície quanto nos primeiros 10 cm do solo. Isto se torna interessante tendo em vista que estudos demonstram a existência de uma correlação positiva entre a contaminação por DON e a quantidade total de resíduos de culturas anteriores no solo (MAIORANO et al., 2008). O cultivo mínimo, situado entre o sistema de cultivo convencional e o sistema de plantio direto, consiste em um preparo mínimo do solo com a finalidade de menor revolvimento e compactação, favorecendo a manutenção das características do solo e protegendo-o de possíveis erosões. No entanto, a biomassa microbiana aumenta na superfície e nos primeiros 10 cm do solo, além dos resíduos presentes manterem a água na superfície do solo, favorecendo a liberação dos esporos de *Fusarium* spp. (CHAMPEIL; DORE; FOURBET, 2004; HORBERG, 2002). Outro aspecto desta demanda por processos alternativos é que resíduos de fungicidas permanecem no solo contribuindo para a seleção de espécies resistentes ou toxigênicas.

3.1.2 Milho

O milho é uma monocotiledônea de distribuição mundial pertencente à família das gramíneas (*Poaceae*), tribo *Maydeae*, gênero *Zea*, cientificamente denominado de *Zea mays* L. (FANCELLI, 1983). Classificado entre os cereais de extrema importância na alimentação humana e animal, apresenta alta eficiência na produção de alimentos com qualidade nutricional, justificando a sua introdução como ingrediente nos mais diversos produtos derivados. A tribo *Maydeae* compreende sete gêneros, sendo cinco asiáticos e dois americanos, onde *Zea mays* pertence ao último grupo. Este por sua vez se subdivide em cinco grupos, denominados de amiláceo, dentado, duro, pipoca e doce (MANGELSDORF, 1974).

Segundo o levantamento do USDA (United States Department of Agriculture) para a safra mundial de milho 2016/17, o Brasil está na terceira colocação entre os países produtores deste cereal (86,5 milhões de toneladas), ficando atrás apenas dos Estados Unidos (384,8 milhões de toneladas) e China (219,6 milhões de toneladas). Quanto ao consumo, o Brasil ocupa o 4º lugar, com 58,5 milhões de toneladas, sendo que a diferença entre produção e consumo é destinada para exportação.

As propriedades nutritivas deste grão decorrem de sua composição (em base seca) rica em carboidratos (71,7%), proteínas (9,5%) e lipídios (4,3%), que conferem também

qualidade tecnológica diversificada a esta matéria-prima. Aliadas a presença de micronutrientes, as proteínas de considerável valor nutricional justificam a aplicação como principal ingrediente nas rações animais, além de contribuição à culinária (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997). Contudo, essa versatilidade no uso também o torna um substrato adequado a micro-organismos indesejáveis, capaz de gerar riscos oriundos de metabólitos secundários e tóxicos produzidos pelos fungos da microbiota cereal.

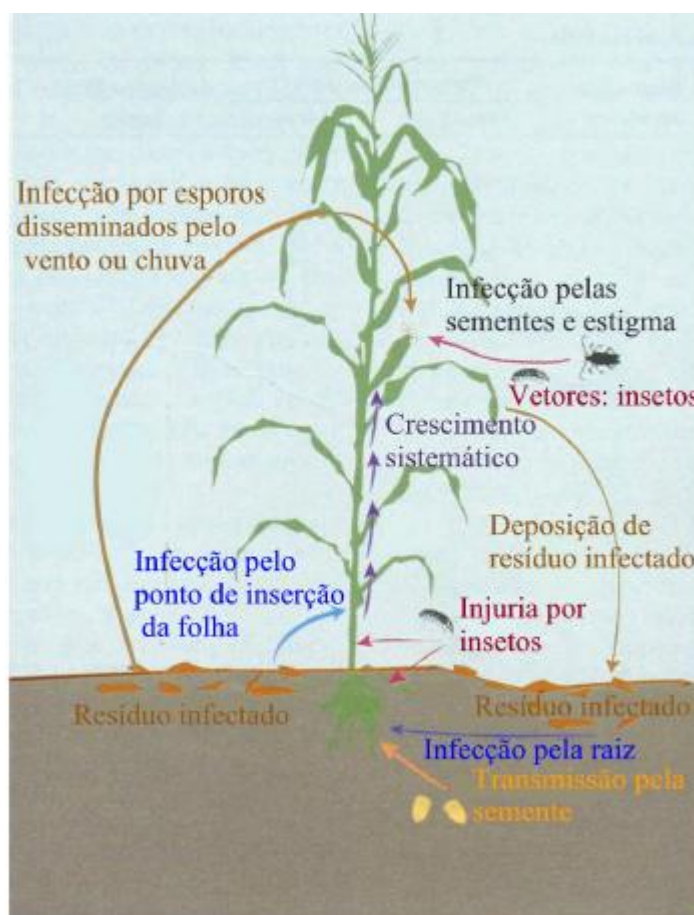
As propriedades intrínsecas do milho associam-se a fatores biológicos de ataques fitopatogênicos e/ou de deterioração, com destaque especial a fungos micotoxigênicos. Além de espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* e *Trichoderma*, as mais frequentes e alvo de atenção na microbiota do milho são *F. verticillioides*, *F. graminearum*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum* e *F. subglutinans* (BLANDINO et al., 2008; MUNKVOLD, 2003; NISHIMWE et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017).

O ciclo de incidência por *Fusarium* é complexo, associado com todas as fases do desenvolvimento da planta. A fusariose parece iniciar com a permanência de fungo nos resíduos de colheitas anteriores, capazes de prolongar a sobrevivência de hifas e contaminar as sementes, seguida de disseminação sistêmica ao colmo e espiga. Outro mecanismo de contaminação decorre do desenvolvimento de esporos durante a germinação, seguida de disseminação total. Também a contaminação pode ser decorrente da disseminação de macro e microconídios pelo ar ou chuva, atingindo diretamente o tecido vegetal, principalmente no estigma. A transmissão por insetos integra o fator vetor com injúria à planta, estabelecendo local adequado para a instalação/germinação de conídios disseminados pelo ar ou chuva (Figura 2) (REYNERI, 2006).

O desenvolvimento da planta de milho é dividido em estádios vegetativos e reprodutivos. O florescimento é o primeiro estágio reprodutivo da planta, onde ocorre a polinização, sendo que um grão de pólen capturado leva cerca de 24 h para descer o estilo-estigma até o óvulo, local onde ocorre a fertilização e a formação do grão. O estresse ambiental neste período causa falhas na polinização e na formação do grão, o que resultará em espigas defeituosas, principalmente com a ponta chocha. Após o florescimento e o início da maturação dos grãos há combinação de redução na fotossíntese e desbalanço na distribuição de açúcares em favor dos grãos. Estes acontecimentos, associados a estresses pós-florescimento, podem favorecer o desenvolvimento de fungos que causam as podridões no colmo. No estágio de grão leitoso (10 a 14 dias após o florescimento) grande parte do grão já cresceu para fora dos materiais circundantes do sabugo e o sabugo está próximo de seu

tamanho total ou já o atingiu. Os estilos-estigmas, tendo completado sua função de florescimento, escurecem e começam a secar. O amido se acumula no endosperma aquoso e os grãos passam por período de rápido e constante acúmulo de matéria seca ou de enchimento de grãos. Eles apresentam agora cerca de 85% de umidade que diminuirá gradualmente até a colheita (RITCHIE; HANWAY; BENSON, 1993).

Figura 2 - Ciclo da fusariose em milho com diferentes vias de infecção, destacando-se a infecção pelos grãos, estigma e injúria por insetos.



Fonte: MUNKVOLD; DESJARDINS (1997).

Os grãos de milho são colonizados por uma ampla variedade de fungos pré e pós-colheita, sendo particularmente susceptíveis à colonização fúngica após ocorrer a emergência do tecido (MILLER et al., 1995). O uso de fungicidas nem sempre é rentável para a cultura do milho, pois depende do potencial de rendimento dos grãos, da susceptibilidade às doenças do híbrido em estudo e da severidade da doença foliar durante todo o período de crescimento, além dos preços do milho no mercado e da aplicação do fungicida (BLANDINO et al., 2012). A ação fungicida pode influenciar diferentes espécies fúngicas, por exemplo, Pirgozliev et al.

(2003) comprovam que a utilização de alguns princípios ativos comerciais pode aumentar a contaminação com espécies toxigênicas de *Fusarium*, e reduzir a contaminação de espécies não toxigênicas.

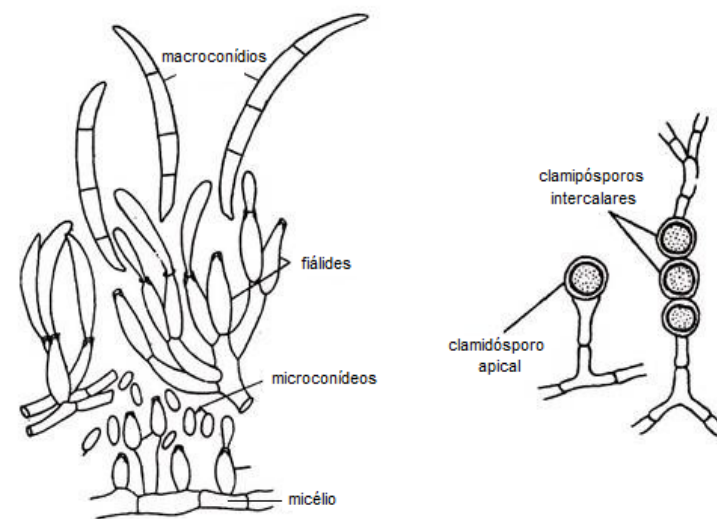
3.2 COMPLEXO DO GÊNERO *Fusarium*

Fungos patogênicos sempre tiveram sua importância relacionada aos danos causados à produtividade de *commodities* agrícolas e às doenças em animais. No entanto, o maior interesse científico pelo caráter toxigênico dos fungos teve início a partir da segunda metade do século XX, com a demonstração de que metabólitos secundários de fungos induzem câncer e doenças hepáticas em animais. Dentre os gêneros de fungos que mais afetam a produção agrícola e a saúde animal, destaca-se o gênero *Fusarium*, fungo cosmopolita capaz de produzir em cereais uma ampla gama de metabólitos secundários tóxicos, encontrados frequentemente em rações e alimentos. Entre os metabólitos produzidos por *Fusarium* destaca-se, além de zearalenona e fumonisinas, a classe de tricotecenos que são compostos sintetizados por *F. graminearum*, responsáveis por micotoxicoses que acometem humanos e animais numa escala global (BRYDEN, 2007).

O gênero *Fusarium* é classificado como um fungo imperfeito, caracterizado por um micélio hialino, ramificado e tabicado, com esporóforos em forma de fiálides e conídios de forma e tamanho variável. Apresenta macroconídeas fusiformes, com vários septos (LEAL et al., 2005) (Figura 3). A faixa de pH para o seu crescimento pode variar de 2 a 8. Por serem aeróbios, qualquer modificação na atmosfera poderá influenciar a produção de toxina. Condições de atmosfera reduzida de oxigênio retardam o crescimento do fungo e pode chegar a inibir completamente o seu desenvolvimento. A temperatura ótima para o crescimento geralmente é de 20 a 30 °C.

O complexo *F. graminearum* é composto por distintas linhagens/espécies filogenéticas, a morfologia por si só não é capaz de distinguir estas diferentes espécies, sendo necessária a utilização de ferramentas de diagnóstico molecular (KONIETZNY; GREINER, 2003). Este complexo possui até hoje 16 linhagens e 15 espécies, tais como: *F. graminearum*, *F. asiaticum*, *F. meridionale*, *F. cortaderiae*, *F. austroamericanu* (AOKI et al., 2012). Da mesma forma, o complexo *F. fujikuroi* possui 50 linhagens e 36 espécies, dentre as quais estão as espécies *F. fujikuroi* e *F. proliferatum* (KVAS et al., 2009). Nota-se que em ambos os complexos, existe uma espécie identificada com o nome do próprio complexo.

Figura 3 - Estruturas reprodutivas do gênero *Fusarium*.



Fonte: LESLIE; SUMMERELL (2006).

Os fungos toxigênicos raramente ocorrem sós em alimentos naturais, eles coexistem com outros fungos e bactérias (DOYLE, 1997). As espécies de *Fusarium*, que são conhecidas como fitopatógenos, são saprófitas do solo com distribuição mundial. O registro de incidência de infecções humanas por *Fusarium* tem aumentado na medicina contemporânea. O *Fusarium* spp., destaca-se não só pela sua agressividade, mas por levar ao óbito a maioria dos pacientes com infecção disseminada. As lesões provocadas por *Fusarium* nos seres humanos podem ser locais ou sistêmicas, as primeiras ocorrem principalmente em decorrência de lesões traumáticas ou infecções secundárias a queimaduras (HENNEQUIN et al., 1999).

No campo, a infecção por *Fusarium* recebe o nome de giberela, sendo uma doença extremamente dependente das condições ambientais, principalmente chuvas prolongadas e alta umidade do ar por ocasião da floração e o desenvolvimento dos grãos na espiga. Esta doença é desencadeada pela adesão de esporos dispersos no ar nas espiguetas, os quais germinam e entram na planta através de aberturas naturais na base da lema e da pálea, ou pelos tecidos degenerados da antera (PRITSCH et al., 2000). No início da infecção, o fungo cresce intercelularmente sem sintomas aparentes (JANSEN et al., 2005). A partir do ponto de infecção, o fungo cresce radialmente, necrosando o tecido colonizado e expressando o sintoma típico da doença, a descoloração das espiguetas infectadas.

Por se tratar de um ascomiceto, geralmente é encontrado na fase haplóide durante grande parte do ciclo, persistindo e se multiplicando como saprófito em resíduos culturais de

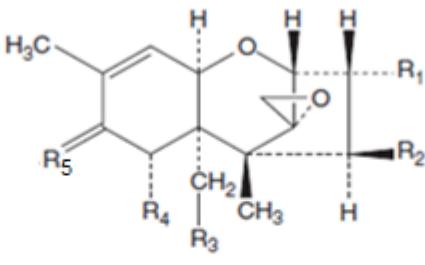
cereais e palhada de milho (MCMULLEN et al., 1997). Desta forma, é capaz de produzir esporos assexuais (macroconídios), que são disseminados pela ação da chuva e do vento. Sob condições ótimas de umidade e molhamento, o desenvolvimento da fase sexual se deve pela formação de hifas dicarióticas (binucleadas) capazes de formar corpos de frutificação conhecidos como peritécios. Estes dão origem às ascas, que abrigam e liberam os esporos sexuais do fungo, os ascósporos, que são carregados pela ação do vento através da turbulência atmosférica e podem alcançar longas distâncias da fonte de origem (ASTOLFI, 2010).

O desenvolvimento sexual é parte crítica no estabelecimento da doença (TRAIL, 2009). No campo, os ascósporos são considerados o inóculo primário da doença, que devido ao curto período de vulnerabilidade à infecção, é considerada monocíclica. As fontes de inóculo local e regional em abundância nos resíduos vegetais devido à ampla adoção de práticas conservacionistas e a falta de resistência nas cultivares comerciais são fatores que incrementam o risco da doença (DEL PONTE et al., 2004). Após a infecção, o fungo possui a capacidade de expressar genes ligados a síntese de toxinas, principalmente aqueles envolvidos na biossíntese de desoxinivalenol (DON), um fator de virulência que causa necrose nos tecidos adjacentes a infecção e permite a evolução do fungo pela raquis, colonizando as espiguetas vizinhas (DESJARDINS; HOHN; MCCORMICK, 1993). A colonização de *F. graminearum* em grãos é acompanhada da acumulação de DON e esta relação está elucidada na interação com trigo (TRAIL, 2009).

3.2.1 Tricotecenos

A principal classe de micotoxinas produzidas por *Fusarium graminearum* é representada por tricotecenos, metabólitos secundários que atuam como potentes inibidores da síntese protéica em eucariotos, resultando em sérias toxicoses em humanos e animais. Os tricotecenos possuem uma estrutura básica sesquiterpenóide e podem ser divididos em classes do tipo A, B, C e D, dependendo da presença ou ausência de grupos funcionais característicos. Os principais tricotecenos sintetizados por *F. graminearum* pertencem ao tipo B, que contém um ceto-grupo na posição C8 do anel sesquiterpenóide (SNIJDERS, 1990). Dentre estes, destacam-se as toxinas DON, que pode ainda possuir um derivado acetil-éster na posição 15 do oxigênio (15-ADON) e um na posição 3 do oxigênio (3-ADON), e Nivalenol (NIV), um derivado oxigenado C-4 de DON (Figura 4).

Figura 4 - Estrutura básica dos tricotecenos.

						
Grupo	Toxina	R1	R2	R3	R4	R5
B	Desoxinivalenol (DON)	- OH	-H	- OH	- OH	= O
	3-O-acetil DON (3-ADON)	-Oac	-H	- OH	- OH	= O
	15-O-acetil DON (15-ADON)	- OH	-H	-OAc	- OH	= O
	Nivalenol (NIV)	- OH	- OH	- OH	- OH	= O
A	Toxina T-2	- OH	-OAc	-OAc	-H	- OIsoval
	Toxina HT-2	- OH	- OH	-OAc	-H	- OIsoval
	Diacetoxiscirpenol (4,15-DAS)	- OH	-OAc	-OAc	-H	-H

Fonte: CAS (2017).

Os tricotecenos são formados a partir de uma molécula sesquiterpenóide (15 carbonos) denominada farnesil-pirofosfato. A biossíntese de tricotecenos decorre desta molécula por intermediário de tricodieno, considerado o precursor desta família. A síntese de tricotecenos compreende a ciclização do anel sesquiterpeno catalizada pela enzima tricodieno sintase, seguida de oito oxigenações e quatro esterificações. A sequência de oxigenações, isomerizações, ciclizações e esterificações levam a molécula básica tricodieno a formar complexas estruturas de tricotecenos tais como diacetoxiscirpenol (DAS), toxina T-2, desoxinivalenol e nivalenol (GOSWAMI; KISTLER, 2004).

A produção de tricotecenos e zearalenona é provavelmente a consequência mais negativa associada à contaminação de trigo por *Fusarium*. São muito conhecidos os efeitos deletérios de *F. graminearum* nos grãos de trigo, destacando o efeito de DON no refinamento da farinha, onde sua presença está associada à redução da proporção de gluteninas resultando na perda da qualidade de panificação (DALCERO et al., 1997).

Além disso, DON e NIV podem ocorrer concomitantemente em algumas regiões de produção de cereais, com valores acima dos aceitáveis. Quanto às implicações toxicológicas, as espécies animais como suínos e aves apresentaram comprovada sensibilidade aos tricotecenos. Em humanos também há evidências de danos ocasionados por eles. A contaminação com estas toxinas promove sintomas que diferem entre as espécies

animais afetadas, entre os níveis de contaminação e as vias de exposição (BRYDEN, 2007; SNIJDERS, 1990; WOLF-HALL, 2007).

Em experimentos com baixa dosagem de tricotecenos foi possível reproduzir sintomas característicos de toxicoses em animais que ingeriram grãos contaminados. Foram observados imunossupressão, anemia, hemorragia e recusa alimentar em suínos e aves (WU, 2007). Além disso, estudos de nutrição animal sugeriram que os tricotecenos possuem caráter teratogênico, mas não carcinogênico (BOTTALICO, 1998).

O DON é também conhecido como vomitoxina, responsável por sintomas como recusa alimentar, diarreia, vômito, hemorragia e dermatite de contato em animais. Em humanos, o decréscimo na taxa de leucócitos, náusea, vômito, anorexia e convulsões estão relacionados a contaminações por *F. graminearum* (BRYDEN, 2007; EHLING et al., 1998).

3.2.2 Fumonisinás

As espécies produtoras de fumonisinas incluem *F. anthophilum*, *F. dlamini*, *F. napiforme*, *F. nygami*, *F. moniforme* e *F. proliferatum*. As duas últimas são produtoras de grandes quantidades de fumonisinas, sendo o *F. moniliforme* a primeira espécie associada com essas micotoxinas (DIAZ; BOERMANS, 1994) e, pela sua frequência de ocorrência, é a espécie mais estudada dentre as produtoras (BLANDINO et al., 2012). Como no caso dos demais fungos toxigênicos os fatores ambientais no campo, durante o transporte e armazenamento afetam a multiplicação e a produção de um ou mais tipos de fumonisinas (GAMANYA; SIBANDA, 2001).

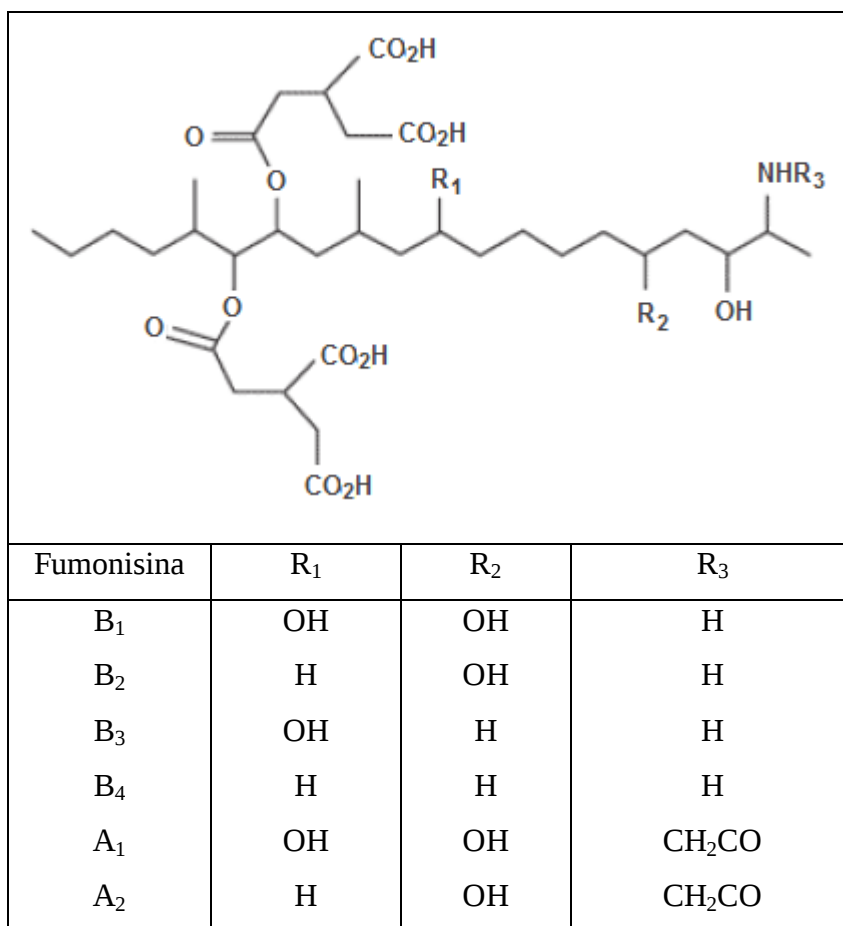
Dezoito diferentes tipos de fumonisinas já foram isolados e identificados diferindo quanto aos grupos hidroxil (Figura 5), porém a forma molecular predominante e mais tóxica produzida pelo *F. moniliforme* é a fumonisina B₁ (FB₁) (SEO; LEE, 1999).

A estrutura básica, bem como seus substituintes, não conferem às fumonisinas a capacidade de interação com a radiação eletromagnética absorvendo ou fluorescendo sem prévia derivação para quantificação por estas técnicas. A FB₁ e a FB₂ apresentam fluorescência verde amarelada após sua derivação (DIAZ; BOERMANS, 1994; SHEPARD, 1998).

A estrutura química da FB₁, um diéster de ácido tricarbálico e álcool polihídrico, é a mais tóxica micotoxina dentre as demais, que não apresentam estruturas cíclicas ou anéis de difícil metabolização e excreção pelo organismo contaminado. Todas as fumonisinas são

estáveis ao calor, como muitas outras micotoxinas, mas quanto à polaridade são solúveis em água e acetonitrila e insolúveis em solventes orgânicos (ALBERTS, et al. 1990; POZZI et al., 2002).

Figura 5 - Estrutura química das principais fumonisinas.



Fonte: CAS (2017).

A ocorrência de fumonisinas em alimentos tem sido relacionada a doenças em animais e possível relação com doenças em humanos, como o câncer de esôfago em regiões onde há grande consumo de milho e derivados, como a África do Sul e China (LI et al., 2015; UDOMKUN et al., 2017). Em ratos contaminados foram observados casos de câncer hepático (CETIN; BULLERMAN, 2005) em equinos a FB₁ é responsável pela ocorrência de leucoencefalomalácia (LEM), uma síndrome que atinge o sistema nervoso central dos cavalos e leva à liquefação da substância branca do cérebro (KIM; SCOTT; LAU, 2003). Em suínos a ingestão de FB₁ pode causar edema pulmonar e hidrotórax (DILKIN et al., 2003). Além disso, estudos têm demonstrado que a exposição à FB₁ resulta em nefrotoxicidade e hepatotoxicidade em todas as espécies animais estudadas (ratos, camundongos, coelhos,

eqüinos, suínos e macacos), aliadas à hipercolesterolemia em determinadas espécies (suínos e macacos) (ABDELLATEF; KHALIL, 2016).

A absorção das fumonisinas no tubo digestivo é rara, são rapidamente eliminadas e retidas, principalmente no fígado e nos rins (FAO/WHO, 2001). O modo de ação destas micotoxinas está relacionado com a sua interferência no metabolismo da esfingosina – esfinganina (So/Sa), prejudicando assim o metabolismo dos esfingolipídeos, responsáveis pela regulação celular e controle de proteínas membranares, regulando o crescimento, diferenciação e morte das células (CIRILLO et al., 2003; HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2011; TURNER; NIKIEMA; WILD, 1999).

3.2.3 Legislação

Dentre as micotoxinas pertencentes ao grupo de tricotecenos, as legislações vigentes no Brasil e na União Europeia delimitam limites máximos toleráveis apenas para o deoxinivalenol e o grupo de fumonisinas é representado pela soma dos teores de fumonisinas B₁ e B₂. Na Tabela 1 estão os limites legislados resumidos para alguns grupos de alimentos.

Tabela 1 - Limites máximos toleráveis de deoxinivalenol e fumonisinas B₁ e B₂ em diferentes alimentos no Brasil e na União Europeia.

Deoxinivalenol				Fumonisina B ₁ + B ₂		
Alimento	Limite máximo tolerável (µg kg ⁻¹)			Alimento	Limite máximo tolerável (µg kg ⁻¹)	
	ANVISA	ANVISA	UE		ANVISA	UE
	(2017)	(2019)	(2007)		(2017)	(2007)
Trigo e milho em grãos	3000	3000	1750	Milho em grão	5000	4000
Trigo integral e para quibe, farelo de trigo, farelo de arroz e grão de cevada	1250	1000	750	Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica	1500	1000
Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos água e sal e produtos de panificação	1000	750	500	Amido de milho e produtos a base de milho	1000	800
Alimentos a base de cereal destinados ao consumo infantil	-	-	200	Alimentos a base de milho destinados ao consumo infantil	-	200

Fonte: BRASIL (2017); UE (2007).

No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) propõe a redução dos níveis permitidos de deoxinivalenol em dois grupos de alimentos no ano de 2019, contudo, esses limites ainda são superiores aos legislados desde 2007 na União Europeia, demonstrando que estudos que envolvam a ocorrência dessas micotoxinas em alimentos, bem como formas de evitar esse tipo de contaminação, são necessários para fundamentar a elaboração de legislações mais rigorosas e assim reduzir o risco de exposição em humanos.

3.3 MICROALGAS

As microalgas compõem um grupo heterogêneo de organismos unicelulares e microscópicos, que apresentam clorofila e outros pigmentos utilizados na fotossíntese (OLAIZOLA, 2003). Acredita-se que tenham surgido há mais de 3 milhões de anos e formaram a atual biosfera, e desde então a regulam no planeta retirando CO₂ e produzindo O₂ (BORGES et al. 2007). Seu cultivo pode ser uma alternativa para minimizar o aumento do efeito estufa, seja pela captação do CO₂ atmosférico durante seu crescimento ou pela possível produção de biocombustíveis renováveis (CHISTI, 2007). Podem ser cultivadas em ambientes inadequados para outros seres vivos, tais como lagos salinos adjacentes a desertos. Elas possuem bom potencial de aproveitamento como fonte de alimento e diversos compostos químicos de interesse (MAADANE et al., 2015; MILLAO; UQUICHE, 2016).

Estes micro-organismos têm papel vital na ecologia do planeta, sendo responsáveis por 45% da produtividade global e são a base da cadeia alimentar aquática. Além disso, podem ser utilizadas nas indústrias farmacêutica e alimentar, como fonte suplementar de ácidos graxos, proteínas, carboidratos, pigmentos e vitaminas. Na aquicultura são utilizadas para a manutenção da qualidade da água e como fonte alimentar complementar (BROWN, 2002). As microalgas são também empregadas há algum tempo no tratamento de efluentes domésticos e industriais (VÍLCHEZ; LOBATO, 1997), o que as torna promissoras como fonte de compostos antimicrobianos.

3.3.1 *Nannochloropsis* sp.

Microalgas do gênero *Nannochloropsis* são amplamente distribuídas nos oceanos e apresentam elevado potencial de absorver CO₂ que resultam na sua alta produtividade e conteúdo lipídico (BORGES, 2005). Elas também se destacam por serem produtoras de um

importante ácido graxo poliinsaturado essencial, o ácido eicopentanóico (EPA) (LOURENÇO, 2006; ZOU et al., 2000).

Esta microalga predominantemente planctônica pertence à divisão *Ochrophyta*, da classe *Eustigmatophyceae*, que compreende oito gêneros e quinze espécies, todas unicelulares cocóides ou coloniais, com distribuição na água doce, no solo úmido e no mar. A espécie possui células esféricas ou ovóides com diâmetro médio de 2 a 4 μm e não são flageladas. A sua parede celular é rígida e composta de polissacarídeos; a estrutura química do seu produto de reserva não é conhecida, mas sabe-se que não se trata do amido. Somente a reprodução assexuada já foi constatada nessa classe e não são conhecidos efeitos nocivos das espécies do gênero *Eustigmatophyceae* na natureza. Por sua facilidade de cultivo, tamanho pequeno, velocidade de crescimento e alto teor de ácidos graxos poliinsaturados essas microalgas são bastante utilizadas na aquicultura, como alimentos para rotíferos e para criar efeito verde em tanques de larvas (ZITTELLI; RODOLFI; TREDICI, 2004).

Segundo a literatura, a composição típica de microalgas do gênero *Nannochloropsis*, em relação ao peso seco de biomassa, apresenta 7,8 – 11,0% de carboidratos; 21,3 – 35,0% de proteínas e 16,2 – 29,7% de lipídios (BORGES, 2005; CAMPOS; BARBARINO; LOURENÇO, 2010; LOURENÇO, 2006).

Campos, Barbarino e Lourenço (2010) determinaram a composição química de diferentes espécies de microalgas, incluindo a *N. oculata*, obtendo 0,90 e 0,30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de clorofila α e carotenoides, respectivamente. Quanto ao perfil de ácidos graxos, esta microalga apresentou 34,6% de saturados, 35,3% de monoinsaturados e 26,8% de poliinsaturados. Baixas taxas de crescimento da espécie são atribuídas ao excesso de nutrientes no meio de cultivo. Quanto a especiação dos aminoácidos constituintes, o mais abundante é o ácido glutâmico (14,9%), seguido do ácido aspártico (11,7%) e da leucina (8,4%)

Custódio et al. (2012) avaliaram a atividade antioxidante de diferentes microalgas, onde o conteúdo de fenóis totais presente em extrato metanólico da microalga *N. oculata* apresentou concentração igual a 4,1 mg g^{-1} , expresso em teor de ácido gálico na biomassa seca. Os autores verificaram a inibição do radical livre DPPH utilizando extratos em metanol e hexano, em diferentes concentrações, chegando aos seguintes percentuais de inibição: 12,2; 35,2 e 59,4% para os extratos em metanol nas concentrações de 1; 5 e 10 mg mL^{-1} , respectivamente; e 5,2; 12,2 e 70,3% para os extratos em hexano nas concentrações de 1; 5 e 10 mg mL^{-1} , respectivamente. Estes resultados indicaram que os compostos antioxidantes da microalga apresentam polaridades diferentes. Nos extratos polares (metanol), a atividade

antioxidante pode ser devido à presença de compostos fenólicos, de acordo com o que já foi observado por Hajimahmoodi et al. (2010). No entanto, nos extratos não-polares (hexano), a inibição detectada não pode ser atribuída à presença de compostos fenólicos, o que difere grandemente de outras espécies de plantas, como frutas, vegetais e plantas medicinais (LI et al., 2007).

3.3.2 *Spirulina* sp.

O gênero bacteriano *Spirulina* pertence a família *Cyanobacterium*, 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, onde a fonte de energia é a luz solar. Estas bactérias são descendentes dos primeiros seres fotossintetizantes e apresentam 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 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).

O componente em maior concentração na biomassa da *Spirulina* é a proteína, variando entre 64 e 74%. As proteínas que possuem maior potencial econômico são as biliproteínas, sendo que a *Spirulina* possui duas biliproteínas: c-ficocianina e aloficocianina, a fração protéica pode conter mais de 20% de ficocianina, um pigmento azul solúvel em água. Lipídios e carboidratos variam entre 6 a 13% e 12 a 20%, respectivamente. A composição de pigmentos da *Spirulina* é típica de uma cianobactéria, a única clorofila presente é a clorofila α , que tem seu peso variando entre 0,8 e 1,5% do peso seco. É considerada excelente fonte de pró-vitamina A (β -caroteno) e de ferro biodisponível, além de outros minerais, compostos fenólicos, ficocianina, ácido gama linoléico e outros ácidos graxos essenciais (BELAY, 2002; VON-DER; DILLON, 2000).

A presença destes compostos na *Spirulina* norteou a sua utilização como alimento pelo homem, tendo em vista sua elevada qualidade e quantidade protéica, aminoácidos essenciais, minerais, ácidos graxos poliinsaturados e vitaminas. Além de possuir grande quantidade de compostos fenólicos (ácidos caféico, clorogênico, salicílico, sináptico e trans-cinâmico), tocoferol e pigmentos como carotenoides, ficocianina e clorofila (AMBROSI et al., 2008).

Ela é considerada um micro-organismo GRAS (“Generally Recognized as Safe”), que não apresenta toxicidade e, portanto, permitida como suplemento alimentar pela “Food and Drug Administration” (FDA). Também está sendo utilizada no desenvolvimento de alimentos funcionais por apresentar efeitos de promoção à saúde, como diminuição da hiperlipidemia, diminuição da pressão arterial, proteção a danos renais, promoção do crescimento de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* na microbiota intestinal, diminuição dos níveis séricos de glicose, aumento da fertilidade e da resposta anti-mutagênica e anti-tumoral (BELAY, 2002; COLLA, BADIALE-FURLONG e COSTA, 2007; PARISI et al., 2009).

A ingestão de *Spirulina* tem mostrado efeito preventivo contra os danos na formação óssea e no 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 à base de *Spirulina platensis* também reduz a hepatotoxicidade induzida pelo cádmio em ratos e o efeito é sugerido para ser mediado através de suas propriedades antioxidantes. *Spirulina* também é conhecida por ter efeitos protetores contra a nefrotoxicidade devido ao dano oxidativo induzido por gentamicina (KARADENIZ; CEMEK; SIMSEK, 2009).

3.4 FUNGICIDAS E ANTIFÚNGICOS NATURAIS

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 (natamicina para queijo), ervas, especiarias, óleos essenciais, antioxidantes e metilxantinas (FONSECA; PICCOLI, 2006).

Pesquisas têm buscado compostos com atividade antioxidante provenientes de fontes naturais, que possam atuar isoladas ou sinergicamente com outros aditivos, pois funcionam como alternativa para prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e limitam o uso dos antioxidantes sintéticos e agentes conservadores. As frutas, hortaliças, grãos e especiarias, além de plantas medicinais, são as fontes convencionais de compostos antioxidantes (OLIVEIRA et al., 2007; SAURA-CALIXTO; GOÑI, 2006).

Shanab et al. (2012) avaliaram a atividade antioxidante e anticâncer de extratos aquosos de nove espécies de microalgas (*Anabaena flos-aquae*, *Anabaena oryzae*, *Nostoc humifusum*, *Nostoc muscorum*, *Oscillatoria* sp., *Spirulina platensis*, *Phormidium fragile*, *Wolleea saccata* e *Chlorella vulgaris*). A atividade antioxidante dos extratos de algas foi realizada através do DPPH e ABTS, resultando em 30,1-72,4% e 32,0-75,9% de inibição, respectivamente.

Farvin e Jacobsen (2013) avaliaram os compostos fenólicos e a atividade antioxidante de 16 espécies de algas coletadas ao longo das costas dinamarquesas e estudaram a inibição da peroxidação lipídica em sistema de modelo lipossomal. Em geral, os ensaios antioxidantes correlacionaram-se com o conteúdo fenólico total, o que indicou que os polifenóis são componentes ativos nesses extratos. No entanto, em alguns dos ensaios antioxidantes algumas espécies com baixo conteúdo fenólico total também apresentaram bons efeitos antioxidantes, indicando que alguns outros compostos ativos foram co-extraídos, tais como pigmentos e tocoferóis em extratos etanólicos e polissacarídeos sulfatados. As proteínas ou os peptídeos solúveis em extratos aquosos também podem contribuir para as propriedades antioxidantes, porém esclarecimentos são necessários.

Além da atividade antioxidante, alguns destes compostos podem atuar como antifúngicos e inibidores da produção de micotoxinas, tais como a aflatoxina, por atuarem na regulação da peroxidação lipídica, inibindo a formação de peróxidos e consequente estresse oxidativo que está relacionado a biosíntese de aflatoxinas (RASOOLI; ABYANEH, 2004; SOUZA et al., 2011). Há evidências científicas que permitem associar essas propriedades principalmente a seus compostos fenólicos (KAUR; KAPOOR, 2002; SOUZA, 2012).

O emprego de microalgas como fonte natural de antifúngicos vem sendo estudado por alguns autores, tais como:

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

Souza (2012), que avaliou o poder de inibição de extratos fenólicos de *Chlorella* sp. e *S. platensis* sobre a multiplicação fúngica de *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus flavus*, bem como sua atividade antioxidante e a atividade antimicotoxinas, da última, contra *Aspergillus flavus*. O extrato fenólico de *Spirulina platensis* apresentou maior capacidade de inibir a

formação da parede e da membrana celular, com inibição média de 50% para ambos os fungos estudados e inibição total da produção de aflatoxina B₁ até o 10º dia cultivo do *Aspergillus flavus*. Estes resultados mostraram que as ações antifúngica e antimicotoxina estão naturalmente presente em alguns tecidos microbianos e que encontrar a forma de extraí-los e aplicá-los como conservantes de alimentos pode ser uma alternativa para a substituição dos antifúngicos e outros conservantes químicos.

Pagnussatt (2013) estudou a atividade antifúngica de compostos fenólicos extraídos de *Spirulina* sp. LEB-18 na forma livre e encapsulada contra espécies filogenéticas do complexo *F. graminearum* isoladas de cereais produzidos no RS. Os resultados mostraram inibição superior a 90% no crescimento de isolados do complexo *F. graminearum* em presença de lipossomas contendo 8% de extrato fenólico (v/v). A produção de glicosamina foi reduzida de 11,5 mg g⁻¹ para 6,1 mg g⁻¹ no meio com lipossoma puro e o extrato fenólico incorporado ao lipossoma, respectivamente, aumentando em 15 e 6 vezes a inibição da produção das micotoxinas NIV e 15-ADON. Ficou demonstrado que a técnica de encapsulamento garantiu a manutenção das propriedades dos compostos bioativos com atividade antifúngica e antimicotoxigênica superior ao extrato fenólico livre.

Christ-Ribeiro et al. (2016) aplicaram compostos fenólicos extraídos de *Spirulina* LEB-18 como conservantes na formulação de massas de pizza, os extratos foram borrifados nas pizzas na concentração de 1,2 mg g⁻¹ e mostraram efeito promissor frente ao conservante químico propionato quanto a contagem de bolores e leveduras até 10 dias após a formulação das massas de pizza.

Estes exemplos demonstram diversas possibilidades para aplicar compostos extraídos da biomassa de microalgas, apesar disso, não existem estudos quanto a ação antifúngica das microalgas em campos experimentais de cereais, fato que norteou a elaboração do presente trabalho.

CAPÍTULO III

**ARTIGO I – EXTRATOS FENÓLICOS DE *Nannochloropsis* sp. e *Spirulina* sp.:
PERFIL DE ÁCIDOS FENÓLICOS, INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E
PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES**

RESUMO

Este estudo teve como objetivos determinar o perfil de ácidos fenólicos nas biomassas de *Nannochloropsis* sp. e *Spirulina* sp. e verificar sua capacidade de inibir enzimas e radicais livres para inferir sobre o seu potencial. As biomassas foram caracterizadas quimicamente, o perfil dos ácidos fenólicos presentes nos extratos de microalgas foram determinados por HPLC-UV e a confirmação da sua identidade foi realizada por LC-MS/MS. A capacidade de inibir a atividade enzimática foi verificada através do uso das enzimas peroxidase e α -amilase e o poder antioxidante dos extratos foi determinado pela inibição dos radicais ABTS⁺ e DPPH. Foram formuladas misturas sintéticas com composição e concentração de ácidos fenólicos idêntica a encontrada nos extratos naturais. O conteúdo fenólico dos extratos de *Spirulina* sp. e *Nannochloropsis* sp. encontrado na fração metanólica foi 628 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 641 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. O extrato natural de *Nannochloropsis* sp. apresentou o maior valor de inibição específica para o ABTS (1,3% $\text{min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$) e inibição da atividade de peroxidase (0,4% $\text{min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$). Os extratos mostraram estabilidade, mantendo o DPPH inibido por 180 min. A enzima α -amilase foi melhor inibida pelo extrato fenólico de *Spirulina* sp. (0,07% $\text{min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$). A análise multivariada confirmou o efeito sinérgico dos ácidos fenólicos presentes nos extratos naturais.

Palavras-chave: *Nannochloropsis* sp., *Spirulina* sp., Compostos fenólicos, LC-ESI-MS/MS, Peroxidase, Amilase.

1 INTRODUÇÃO

As microalgas são um dos sistemas biológicos mais eficientes que transformam a energia solar em compostos orgânicos pela fotossíntese. Acredita-se que tenham surgido há mais de 3 milhões de anos e tenham contribuído não só para a formação da atual atmosfera terrestre, mas também para a manutenção do equilíbrio da biosfera, removendo CO₂ e produzindo O₂ (ROMANO et al., 2000). Estes micro-organismos, como fontes de produtos e nutrientes indispensáveis à qualidade da vida humana, são mais vantajosos do que os vegetais e animais superiores devido à sua rápida reprodução, fácil crescimento em áreas não apropriadas para a agricultura e a possibilidade de se implementar produção de vários compostos de interesse comercial, como clorofila, vitaminas e compostos fenólicos, em condições de crescimento controlado (BORGES et al., 2011; COLLA et al., 2007).

Estes micro-organismos podem ser cultivados em ambientes adversos, como lagos de sal adjacentes aos desertos. Como resultado, as microalgas podem se tornar uma excelente fonte de compostos, como os fenólicos, que conferem resistência celular contra danos endógenos e exógenos. Estes compostos são sintetizados no metabolismo secundário de vegetais e micro-organismos cuja função principal consiste na defesa contra ataques de pestes, além de danos físicos e químicos. A ação de compostos fenólicos tem sido atribuída à sua estrutura química, que tem um ou mais anéis aromáticos, substituídos por um ou mais grupos hidroxílicos, lhes permitindo reagir com os radicais livres e se manterem estáveis (QUIDEAU et al., 2011).

Desta forma, há algum tempo tem sido recomendada sua utilização para o tratamento e prevenção de alguns tipos de câncer, doenças cardiovasculares e outros distúrbios causados pelo estresse oxidativo (FERGUSON; HARRIS, 1999). Considerando que a célula que apresenta estes compostos torna-se mais resistente aos ataques fúngicos, foi verificado que alguns deles atuam como inibidores de hidrolases e oxidoredutases, reduzindo o estresse oxidativo e como consequência podem impedir a manifestação do potencial toxigênico dos fungos (BEMVENUTI, 2014; MENDES et al., 2015; PAGNUSSATT et al., 2014).

Atualmente, há uma ampla discussão sobre a aplicabilidade de fenólicos bioativos e muitos autores propuseram ação biológica através do sistema intestinal, onde os polifenóis poderiam participar na modulação da microflora (EKBATAN et al., 2016; JIA; DUMONT; ORSAT, 2016; RASHIDINEJAD; BIRCH; EVERETT, 2016). Contudo, devido a vários

fatores que levam ao desenvolvimento e disseminação de radicais livres, dificilmente haverá um método capaz de representar a atividade antioxidante real de um composto ou sua família de maneira segura e precisa (QUIDEAU et al., 2011). Portanto, é importante usar mais de um método para avaliar a capacidade antioxidante de uma fonte, a fim de inferir seu efeito protetor.

A primeira observação de ácidos fenólicos em cianobactérias e algas foi publicada em 2009-2010, incluindo *Spirulina* spp. (BIERHALS et al., 2009; KLEJDUS et al., 2009; ONOFREJOVÁ et al., 2010). A partir daí, extratos de *Spirulina* e outras microalgas foram estudados em termos de seus efeitos protetores contra o estresse oxidativo. Além disso, foi demonstrado que o perfil de ácidos fenólicos afeta a capacidade antioxidante. Pagnussatt et al. (2014) e Souza et al. (2011) também afirmaram que esses extratos são promissores antifúngicos agindo como inibidores de enzimas dos micro-organismos.

A microalga *Nannochloropsis* sp., que tem sido utilizada para a alimentação em aquicultura e como fonte de ácidos graxos, é mais vantajosa do que outras microalgas cultivadas, devido à quantidade de biomassa seca que gera (BANSKOTA et al., 2012; CUSTÓDIO et al., 2012). Além disso, sua composição e suas propriedades sugerem que ela constitui-se numa fonte de antioxidantes naturais, como resultado de sua capacidade de sobreviver em condições adversas. No entanto, este micro-organismo não é avaliado profundamente quanto a sua capacidade para produzir compostos antifúngicos, sendo importante explorar sobre esta propriedade que é sugerida pelo seu comportamento no ambiente.

Desta forma, este estudo teve como objetivo determinar as frações fenólicas de *Spirulina* sp. e *Nannochloropsis* sp., investigando a sua capacidade de inibição de enzimas e radicais livres, para inferir sobre o potencial antifúngico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS BIOMASSAS DE MICROALGAS

A biomassa de *Spirulina* sp. (LEB-18) foi fornecida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), localizado em Rio Grande, RS. Produzida em condições de agitação em tanques de fibra de vidro com água da lagoa Mangueira (33° 30' 13" S e 53° 08' 59" O), suplementado com 20% (v/v) de meio

Zarrouk. A biomassa da microalga foi separada por filtração após atingir a concentração de 1 g L^{-1} (MORAIS et al., 2009).

A biomassa de *Nannochloropsis* sp. (NANN-OCUL-1) foi cultivada no Laboratório de Fitoplâncton e Micro-organismos Marinhos da FURG, em meio f/2 (GUILLARD, 1975), salinidade 28 (Unidades Práticas de Salinidade), a 20°C , $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo 12 h claro / escuro (BORGES et al., 2011).

As biomassas das microalgas, coletadas e centrifugadas, foram secas em secadores de bandejas a 50°C durante 5 h, moídas até 32 mesh, embaladas a vácuo e armazenadas à 4°C até a realização das determinações analíticas.

A caracterização química das biomassas obedeceu à AOAC (2000). Os ácidos graxos foram determinados através da esterificação dos lipídeos, mediante extração por Folch, Lees e Sloane-Stanley (1957) e esterificação por Metcalfe e Schmitz (1966). Para separar e identificar a mistura de ácidos graxos esterificados foi empregado cromatógrafo a gás (Shimadzu 2010 Plus), equipado com injetor split/splitless, coluna capilar RTX®-1 (30 m x 0,25 mmID x 0,25 μm) e detector por ionização de chama (DIC). O gás de arraste foi hélio em uma vazão de $1,25 \text{ mL min}^{-1}$ e as temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas para 260°C , sendo o volume injetado de 1 μL . As condições cromatográficas de separação foram temperatura inicial da coluna 50°C , elevando-se para 200°C , a taxa de 6°C min^{-1} , permanecendo nesta temperatura por 4 min; na segunda rampa de temperatura a taxa de aumento foi 2°C min^{-1} até 240°C , permanecendo por 10 min. A comparação dos tempos de retenção com padrões de ésteres metílicos foi usada para identificação do perfil de ácidos graxos das amostras.

2.2 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO FENÓLICO NOS EXTRATOS DE MICROALGAS

2.2.1 Extração

Os compostos fenólicos solúveis em metanol foram extraídos a partir de 6 g de biomassa homogeneizada com 20 mL de metanol em shaker orbital (Tecnal, TE-141, Erechim, Brazil) a 25°C por 60 min a 200 rpm. A agitação foi interrompida por 15 min e reiniciada por 90 min após a adição de 20 mL de metanol. Os extratos foram centrifugados a 3020 g por 10 min a temperatura ambiente, filtrados em papel Whatman nº 1, evaporados em

rota evaporador (Fisatom, 801-802, São Paulo, Brazil) a 50 °C, ressuspensos em 40 mL de água destilada estéril e clarificados com 10 mL de Ba(OH)_2 0,1 mol L⁻¹ e 10 mL ZnSO_4 5%. Os extratos clarificados foram filtrados a vácuo (Marconi, MA 454, São Paulo, SP) com membrana estéril (poro de 0,25 µm) (PAGNUSSATT et al., 2014).

Os compostos fenólicos solúveis em etanol foram extraídos em etanol a 80% [1: 3 (m/v)] a 300 rpm durante 10 min, seguido de centrifugação a 3020 *g* a 10 °C durante 15 min (este procedimento foi realizado duas vezes). A fração solúvel foi evaporada e ressuspensa em água destilada estéril.

O resíduo sólido foi utilizado para extração de compostos fenólicos ligados, através da adição de 10 mL de hexano e agitação a 300 rpm por 10 min. Após a extração foi realizada a centrifugação a 3020 *g* a 10 °C durante 20 min e o solvente foi removido por filtração através do papel de filtro Whatman nº1. A fase sólida foi hidrolisada com 60 mL de NaOH 4 mol L⁻¹ em fluxo de nitrogênio, a 250 rpm e 25 °C. Após 4 h, acidificou-se até pH 1 com HCl 6 mol L⁻¹, centrifugou-se a suspensão a 3020 *g*, a 10 °C durante 40 min e depois utilizou-se o sobrenadante para partição com acetato de etila (três vezes de 30 mL). A fração resultante foi filtrada em papel filtro Whatman com Na_2SO_4 anidro e evaporada em evaporador rotativo a 60 °C para ressuspensão final em água destilada estéril (SCAGLIONI et al., 2014). Outros estudos mostraram que esta temperatura não afeta significativamente a concentração ou a capacidade antioxidante dos ácidos fenólicos (ASPÉ E FERNÁNDEZ, 2011; MOKRANI E MADANI, 2016; SANTOS et al., 2016).

2.2.2 Quantificação

Primeiramente os compostos fenólicos dos extratos foram quantificados em espectrofotômetro UV-Vis (modelo Cary 100-Varian) com o reagente Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999). Foram utilizadas curvas padrão de adições sucessivas para estimar suas concentrações de forma confiável (variando na faixa de 2,5 a 24,6 µg mL⁻¹), foram utilizados padrões de ácidos fenólicos encontrados em maior quantidade em cada extrato.

Os ácidos fenólicos normalmente encontrados nos extratos de algas (MIN et al., 2012) (padrões Sigma-Aldrich: ácido caféico, clorogênico, cumárico, ferúlico, gálico, hidroxibenzóico, protocatecóico, siríngico e vanilina) foram determinados utilizando alíquota seca sob nitrogênio e ressuspensa em metanol:água ultrapura (1:1), estes foram separados por cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu, Tóquio, Japão, CLASSE-M10A) acoplada

à detecção de radiação ultravioleta, com o uso de uma coluna de fase reversa C18 (4,6 x 250 mm, 5 µg, Discovery, EUA). A fase móvel eluiu a vazão de 0,7 mL min⁻¹, a 35 °C, com eluição isocrática de solventes compostos por metanol e água acidificada (ácido acético a 1%) na proporção 20:80 (v/v) durante 25 min. A detecção foi conduzida a 280 nm até 15 min de eluição e a 320 nm até ao final de 25 min (SCAGLIONI et al., 2014).

A eficiência da separação cromatográfica foi estimada pelo fator de retenção (k) obtido pela relação entre o tempo de retenção ajustado de cada ácido fenólico e o tempo morto. O fator de separação (α) foi estimado entre dois ácidos fenólicos que eluem em picos adjacentes (razão kA / kB) (US-FDA, 2000).

Para confirmar os resultados, os extratos foram submetidos a análise por HPLC em cromatógrafo líquido Alliance 2695 Separations Waters (Milford, MA, EUA) acoplado com detector de massa (LC-ESI-MS/MS) equipado com amostrador automático, um desgaseificador de membrana e uma bomba quaternária. A espectrometria de massa foi realizada em Micromass Quattro Micro™ API (Waters, Milford, EUA) com interface de ionização por eletro spray (ESI). Adicionalmente, a aquisição de dados foi realizada com o software Masslynx 4.0 e utilizou-se uma coluna Waters XTerra® MS C18 de 3,5 µm 144 Å (50 x 3 mm i.d.). A fase móvel foi constituída por metanol: H₂O ultrapura com ácido acético a 0,1% (90:10 v/v), com eluição isocrática e vazão de 0,3 mL min⁻¹. As condições de fragmentação foram: temperatura da fonte 100 °C, temperatura de dessolvatação 400 °C, fluxo de gás de dessolvatação (N₂) e fluxo de gás de cone 500 e 50 L h⁻¹, respectivamente. A tensão capilar foi 4 kV e o extrator 2 V. As condições de fragmentação foram baseadas em Baskaran, Pullencheri e Somasundaram (2016); Gruz, Novák e Strnad (2008) e Singh et al. (2016), as transições de íon precursor com íon produzido para cada ácido expressa em m/z^{-1} foram: 169>125 (ácido gálico); 153>109 (ácido protocatecóico); 353>191 (ácido clorogênico); 137>193 (ácido 4-hidroxibenzóico); 179>135 (ácido caféico); 197>182 (ácido siríngico); 163>119 (ácido 4-cumárico); e 193>134 (ácido ferúlico). Com voltagem do cone 25 V e energia de colisão 16 eV.

2.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E INIBIÇÃO ENZIMÁTICA DOS EXTRATOS DE MICROALGAS

A atividade antiradical dos extratos de microalgas foi estimada por quatro métodos diferentes, com algumas alterações (2.2.1; 2.2.2; 2.2.3; 2.2.4). Foram utilizados

apenas os extratos fenólicos da fração metanólica, tendo em vista melhores resultados obtidos em ensaios preliminares (resultados não apresentados).

Soluções com a mistura dos padrões de ácidos fenólicos comerciais purificados mais abundantes encontrados nos extratos das microalgas também foram formuladas com as mesmas proporções encontradas nos extratos naturais, sendo denominadas “misturas sintéticas”. Estas também foram utilizadas nos métodos de atividade antioxidante e inibição enzimática, a fim de comparar a eficiência dos extratos naturais.

2.3.1 Inativação do radical catiônico ABTS⁺

O radical foi gerado pela oxidação de ABTS 7 mmol L⁻¹ com persulfato de potássio 2,45 mM, a mistura (1:1) foi mantida em repouso durante 16 h à temperatura ambiente, protegida da luz. Após, a solução foi diluída para se obter uma absorvância de cerca de 0,7 (a 734 nm) em espectrofotômetro. Alíquotas dos extratos foram utilizadas em diluições diferentes (3; 5 e 10 µg mL⁻¹) para determinar a capacidade de captura do radical catiônico. Com base nos resultados da captura de ABTS⁺, foi realizada uma regressão linear correlacionando a porcentagem de inibição e a concentração de compostos fenólicos encontrados em cada extrato. Assim, as equações foram geradas e os respectivos valores de IC₅₀ foram calculados, que corresponde à concentração inibitória mínima para capturar 50% do radical ABTS (BHOYAR et al., 2011).

2.3.2 Inibição do radical livre DPPH

A determinação do consumo do radical livre DPPH pelos extratos baseou-se na diminuição da unidade de absorvância determinada em espectrofotômetro a 515 nm. Foram adicionados aos tubos de ensaio 0,5 mL de água (controle) e 0,5 mL da solução em estudo com 3,0 mL da solução de DPPH (5 10⁻⁵ mol L⁻¹). A mistura reativa foi mantida à temperatura ambiente, protegida da luz, e a mudança de violeta para amarelo foi medida a 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min da reação (HERRERO et al., 2005). A capacidade de sequestrar o radical livre foi expressa como a porcentagem de inibição de oxidação do radical em cada intervalo de tempo, de acordo com a Equação 1, onde A_{DPPH} = absorvância do controle e A_{Extr} = absorvância do extrato das amostras

$$\% \text{ inibição} = \frac{(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Extr}})}{A_{\text{DPPH}}} \cdot 100 \quad (1)$$

2.3.3 Inibição da atividade da peroxidase

A enzima peroxidase foi obtida a partir de batata rosa (*Solanum tuberosum*). As batatas escolhidas foram lavadas, secas, descascadas e picadas em cubos com cerca de 1 cm³. Foi adicionado tampão fosfato 0,010 mol L⁻¹, pH 5, na proporção 1:10 (m/v) ao material homogeneizado e a mistura foi submetida a agitação orbital durante 60 min a 100 rpm à temperatura ambiente. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 3220 g, a 4 °C durante 10 min, filtrou-se e avolumou-se para 50 mL com o tampão. Em uma alíquota de 20 mL do extrato enzimático foram adicionados 10 g de sulfato de amônio e 20 mL de acetona (homogeneização manual durante 1 min). A suspensão repousou durante 60 min e foi centrifugada a 3220 g a 4 °C durante 20 min. As frações de topo (acetona) e no fundo (sal) foram removidas de modo que apenas o precipitado com a peroxidase fosse empregado. Este foi ressuspenso com 20 mL de tampão fosfato 5 mmol L⁻¹ pH 5,5, homogeneizado durante 2 min e filtrado (CARDINALI et al., 2011).

O procedimento para a determinação da atividade da enzima peroxidase está descrito no Anexo 1 (DEVAIAH; SHETTY, 2009). A reação de oxidação do substrato (guaiacol) ocorreu com a ajuda do co-fator H₂O₂ em meio tamponado e foi catalisada pela adição de peroxidase ou inibida pela adição de extrato fenólico.

Uma unidade da atividade da enzima peroxidase foi definida como a quantidade de proteína que desencadeia o aumento em 0,001 unidades de absorvância por minuto (GARDA-BUFFON; BADIALE-FURLONG, 2010). A determinação da atividade enzimática específica levou em consideração a quantidade de proteína no meio reacional (mg mL⁻¹), estimada conforme Lowry et al. (1951) com base na curva padrão de albumina de soro bovino (faixa de 0,1 a 0,4 mg mL⁻¹).

A atividade inibitória dos extratos de microalgas foi expressa como a percentagem de inibição da reação de escurecimento, em relação ao controle (100%).

2.3.4 Inibição da atividade de α -amilase

Para esta determinação utilizou-se a enzima comercial α -amilase de *Aspergillus oryzae* (Fungamyl® 800L, CEE 2006/121, Novozymes Latin America, Paraná, Brasil). A

atividade da solução enzimática foi determinada pela degradação do amido estimada pelo método iodométrico (GARDA-BUFFON; BARAJ; BADIALE-FURLONG, 2010). O procedimento está descrito no Anexo 2. Um controle foi realizado com água no lugar do extrato enzimático e o “controle inibidor” continha cada extrato fenólico sob investigação (extratos naturais e misturas sintéticas de ambas as microalgas). Nos controles, a atividade enzimática foi determinada sem inibidores. A percentagem de inibição de cada inibidor foi estimada pela relação da atividade enzimática sem inibidor (100%) com a atividade resultada da presença de cada inibidor.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de variância (ANOVA) foi aplicada aos resultados da determinação da atividade antioxidante, seguida do teste de Tukey com nível de confiança de 95%. Para verificar a influência de diferentes ácidos fenólicos encontrados nas microalgas no potencial antioxidante, foi utilizada análise multivariada com o software PAST. A análise de componentes principais (PCA) foi aplicada ao conjunto de dados após a normalização pela matriz de correlação de Pearson. O PCA transforma as variáveis previamente medidas em novas variáveis não-correlacionadas, denominadas componentes principais (BERRUETA; ALONSO-SALCES; HEBERGER, 2007; PATRAS et al., 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 COMPOSIÇÃO DAS BIOMASSAS

Este estudo teve como objetivo explorar a possibilidade de aplicação dos compostos traços produzidos no metabolismo secundário das microalgas, principalmente frações fenólicas, que possuem propriedades funcionais que interessam a indústria alimentícia, especialmente como conservantes naturais. Estes podem ser extraídos das biomassas sem prejuízo dos conteúdos e qualidade dos componentes de uso convencional e consagrados destas biomassas de microalgas.

3.1.1 Macro-componentes

A composição proximal da biomassa de microalgas encontrada neste estudo (Tabela 1) confirma o alto teor protéico relatado por outros autores para a *Spirulina* (MORAIS et al., 2009) e o elevado conteúdo lipídico da *Nannochloropsis* sp. (VOOREN et al., 2012). Estas biomoléculas são os principais focos de estudos de microalgas como fontes de compostos de interesse biológico para fortalecer formulações de alimentos ou para produzir biodiesel. Elas também são estudadas como fonte de ácidos graxos essenciais para serem utilizados na indústria alimentícia e farmacêutica.

Tabela 1 - Composição proximal [% (CV%)] das biomassas de microalgas.

	<i>Spirulina</i> sp.	<i>Nannochloropsis</i> sp.
Umidade	14,7 (0,9)	8,5 (1,8)
Cinza	8,9 (0,8)	9,7 (7,8)
Lipídeos	8,6 (2,7)	39,1 (1,6)
Proteína	51,3 (5,4)	27,0 (0,2)
Fibra	1,6 (9,2)	0,6 (7,2)
Carboidratos	14,9*	15,1*

CV = coeficiente de variação. *estimados por diferença.

O perfil de ácidos graxos das microalgas está apresentado na Tabela 2 e foi verificada composição distinta entre elas, sendo que o composto majoritário encontrado na biomassa de *Nannochloropsis* sp. foi o ácido elaídico (62%) e na *Spirulina* sp. o palmitoléico (41%). Foram encontrados quatro ácidos graxos essenciais na biomassa de *Nannochloropsis* sp., γ -linolênico (6,9,12-Octadecatrienóico), α -linolênico (9,12,15-Octadecatrienóico), araquidônico (5,8,11,14-Eicosatetraenóico) e timnodônico (5,8,11,14,17-Eicosapentaenóico), sendo que os dois primeiros também foram encontrados na biomassa de *Spirulina* sp.

A proporção de ácidos graxos quanto a presença de insaturações mostrou que a *Nannochloropsis* sp. apresenta o dobro de poliinsaturados comparativamente a *Spirulina* sp.

Em microalgas, a quantidade de lipídios produzidos, bem como o perfil de ácidos graxos, pode mudar com base nas condições ambientais. Os triglicerídeos são formados principalmente por ácidos graxos saturados e monoinsaturados, enquanto os ácidos graxos poliinsaturados são componentes importantes das membranas das microalgas, que apresentam respostas rápidas às mudanças ambientais, como variações de temperatura, luz e pH

(GUSCHINA; HARWOOD, 2006). O pH alcalino pode levar à acumulação de triglicéridos e a uma diminuição dos lípidos da membrana. Durante as mudanças súbitas do meio ambiente, como o aumento do pH, a síntese de ácidos graxos poliinsaturados pode ser mais lenta e os triglicéridos ricos em ácidos graxos poliinsaturados podem doar grupos acilo aos lipídios polares para permitir a reorganização das membranas e uma resposta mais rápida de adaptação das células (KHOZIN-GOLDBERG; SHRESTHA; COHEN, 2005).

Os compostos encontrados em traços, como os ácidos fenólicos, são produzidos como mecanismos de defesa e estão, normalmente, dentro das células, sendo que os mais hidrossolúveis podem ser excretados para o meio durante o cultivo (PARNIAKOV et al., 2015). O método utilizado para a extração a partir da biomassa deve ser capaz de liberá-los sem qualquer perda dos demais componentes.

Tabela 2 - Composição de ácidos graxos (%) das biomassas de *Nannochloropsis* sp. e *Spirulina* sp.

Ácido graxo	<i>Nannochloropsis</i> sp.	<i>Spirulina</i> sp.
C14:1	-	0,05
C15:1	0,31	-
C16:0	2,88	7,27
C16:1	24,39	41,19
C17:0	-	0,19
C17:1	-	0,12
C18:0	-	23,98
C18:1n9	62,10	21,64
C18:2n6	1,63	2,27
C18:3n6 (essencial)	1,62	0,92
C18:3n3 (essencial)	1,13	1,27
C20:1n9	-	0,09
C20:2	-	0,78
C20:3n6	-	0,41
C20:4n6 (essencial)	6,37	-
C20:5n3 (essencial)	0,19	-
Total saturado	2,88	31,44
Total monoinsaturado	86,80	63,09
Total poliinsaturado	10,94	5,65

3.1.2 Componentes fenólicos

Os parâmetros de eficiência dos métodos espectrofotométricos e cromatográficos (Tabela 3), mostraram que ambos têm coeficientes de determinação adequados, de acordo com as recomendações da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, 1998) que estimam valores de R^2 igual a 0,9.

Tabela 3 - Parâmetros de validação dos métodos espectrofotométrico e cromatográfico usados para determinar os compostos e ácidos fenólicos.

Método espectrofotométrico					
Extrato	Limite de detecção ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Linearidade ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	R^2		
<i>Spirulina</i> sp.	Solúvel em metanol	0,8	2,5-22,5	0,975	
	Solúvel em etanol	0,9	2,7-24,6	0,965	
	Insolúvel (ligados)	0,8	2,7-21,8	0,948	
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Solúvel em metanol	0,8	2,5-22,5	0,969	
	Solúvel em etanol	0,9	2,7-19,1	0,968	
	Insolúvel (ligados)	0,9	2,7-24,6	0,933	
Método cromatográfico (HPLC-UV)					
Ácido fenólico	Limite de detecção ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Linearidade ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	R^2	Fator de retenção (k)	Fator de separação (α)
Gálico	0,12	0,36-3,6	0,998	5,4	
					1,35
Protocatecóico	0,27	0,81-8,1	0,999	7,3	
					1,25
Clorogênico	0,41	1,23-12,3	0,999	9,2	
					1,17
Hidroxibenzóico	0,32	0,96-9,6	0,999	10,7	
					1,18
Caféico	0,24	0,72-7,2	0,999	12,6	
					1,13
Siríngico	0,25	0,75-7,5	0,999	14,2	
					1,14
Vanilina	0,18	0,54-5,4	0,999	16,2	
					1,32
Cumárico	0,19	0,57-5,7	0,999	21,4	
					1,24
Ferúlico	0,25	0,75-7,5	0,999	26,6	

O método cromatográfico permitiu que o limite de quantificação dos ácidos fenólicos diminuísse cerca de três vezes com relação ao método espectrofotométrico, fato importante para garantir a confiabilidade analítica quando o objetivo é determinar componentes a nível traço em matrizes biológicas. O detector ultravioleta determinou qualitativamente e quantitativamente os ácidos fenólicos e a análise por LC-ESI-MS/MS confirmou a presença destes.

O fator de retenção dos ácidos fenólicos separados por cromatografia variou entre 5,4 e 26,6. Na literatura os valores ideais para este fator variam entre 2 e 10, pois maiores faixas levam ao aumento do pico e do tempo de análise (US-FDA, 2000). Contudo, neste estudo, determinaram-se nove compostos em 25 min com fatores de separação acima de 1 e sequência de eluição apropriada, sem sobreposição e nem alargamento dos picos. Figuras 1 e 2 mostram os cromatogramas de eluição dos padrões e dos extratos fenólicos extraídos com metanol de ambas as microalgas.

A identificação dos ácidos fenólicos encontrados nas microalgas (Tabela 4) mostrou que cada solvente utilizado para extração tem composição diferente, apresentando alta diversidade química e de concentração.

Como esperado, a quantificação de compostos fenólicos solúveis em extratos alcoólicos pelo método espectrofotométrico apresentou concentrações mais altas do que a soma dos ácidos fenólicos identificados por cromatografia líquida para todos os extratos obtidos. Esta diferença foi cerca de três vezes no caso de compostos solúveis em metanol e vinte vezes no caso de compostos solúveis em etanol a partir da *Nannochloropsis* sp. e para os ligados a partir da *Spirulina* sp., todos estatisticamente diferentes dos valores obtidos por cromatografia ($p < 0,05$). Este fato é uma evidência da presença de outros compostos com caráter redutor, tais como fenóis não ácidos, os quais podem ter atividade biológica de interesse, para futuros estudos.

O perfil dos ácidos fenólicos identificados nos extratos da biomassa de *Spirulina* sp. foi similar ao relatado por Pagnussatt et al. (2014) e Souza et al. (2011), que também encontraram ácidos gálico, salicílico, trans-cinâmico e clorogênico. No entanto, existem poucos estudos de identificação de ácidos fenólicos encontrados em espécies de *Nannochloropsis*, cujos relatos mencionaram a quantificação espectrofotométrica de fenóis totais (AHMED et al., 2014; CUSTÓDIO et al. 2012; MAADANE et al., 2015). Tendo em vista que os compostos fenólicos são sintetizados como resultado de condições ambientais, pode-se esperar variação nos perfis de ácidos fenólicos inerentes a cada micro-organismo, como resultado do cultivo e de seus parâmetros.

Figura 1 - Cromatograma (HPLC-UV) dos ácidos fenólicos solúveis em metanol: padrões sintéticos (a); (b) *Spirulina* sp. (c) *Nannochloropsis* sp. 1. Ácido gálico; 2. Protocatecóico; 3. Clorogênico; 4. Hidroxibenzóico; 5. Caféico; 6. Sirínico; 7. Vanilina; 8. Cumárico; 9. Ferúlico.

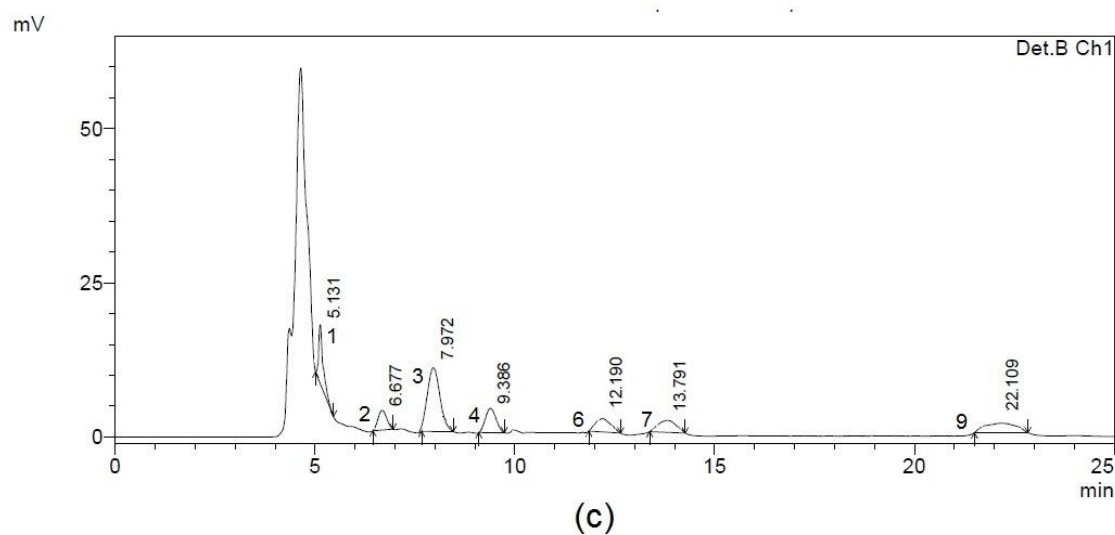
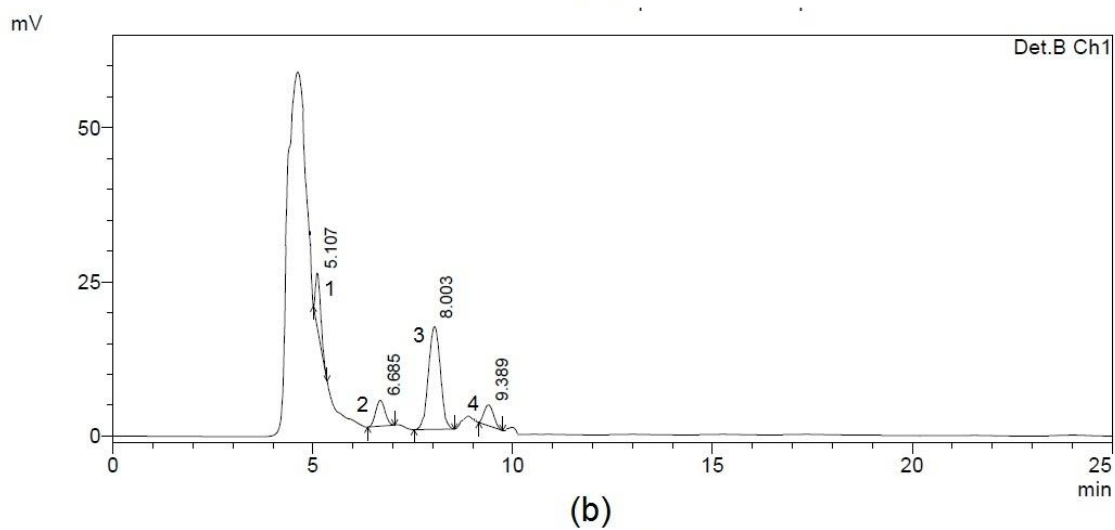
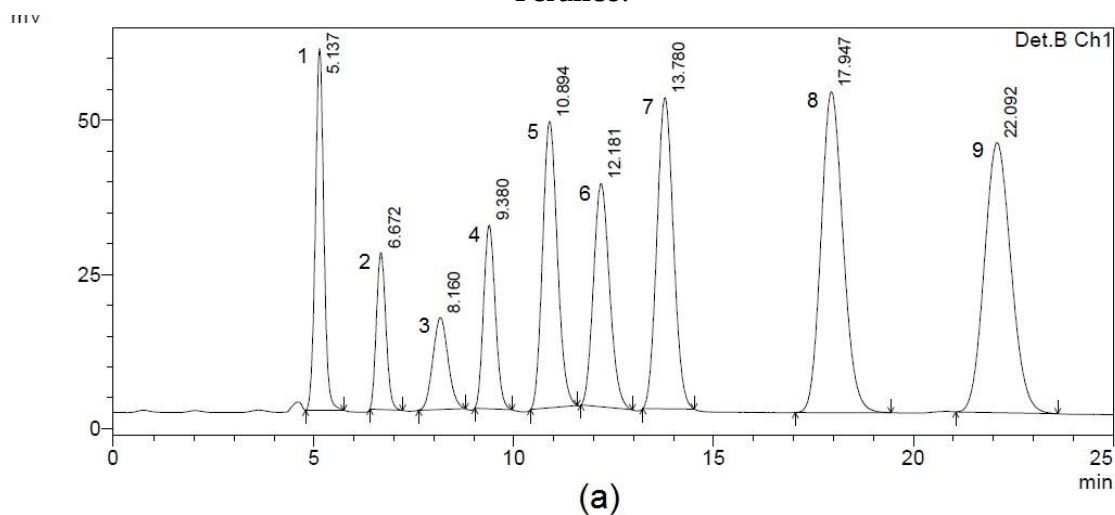
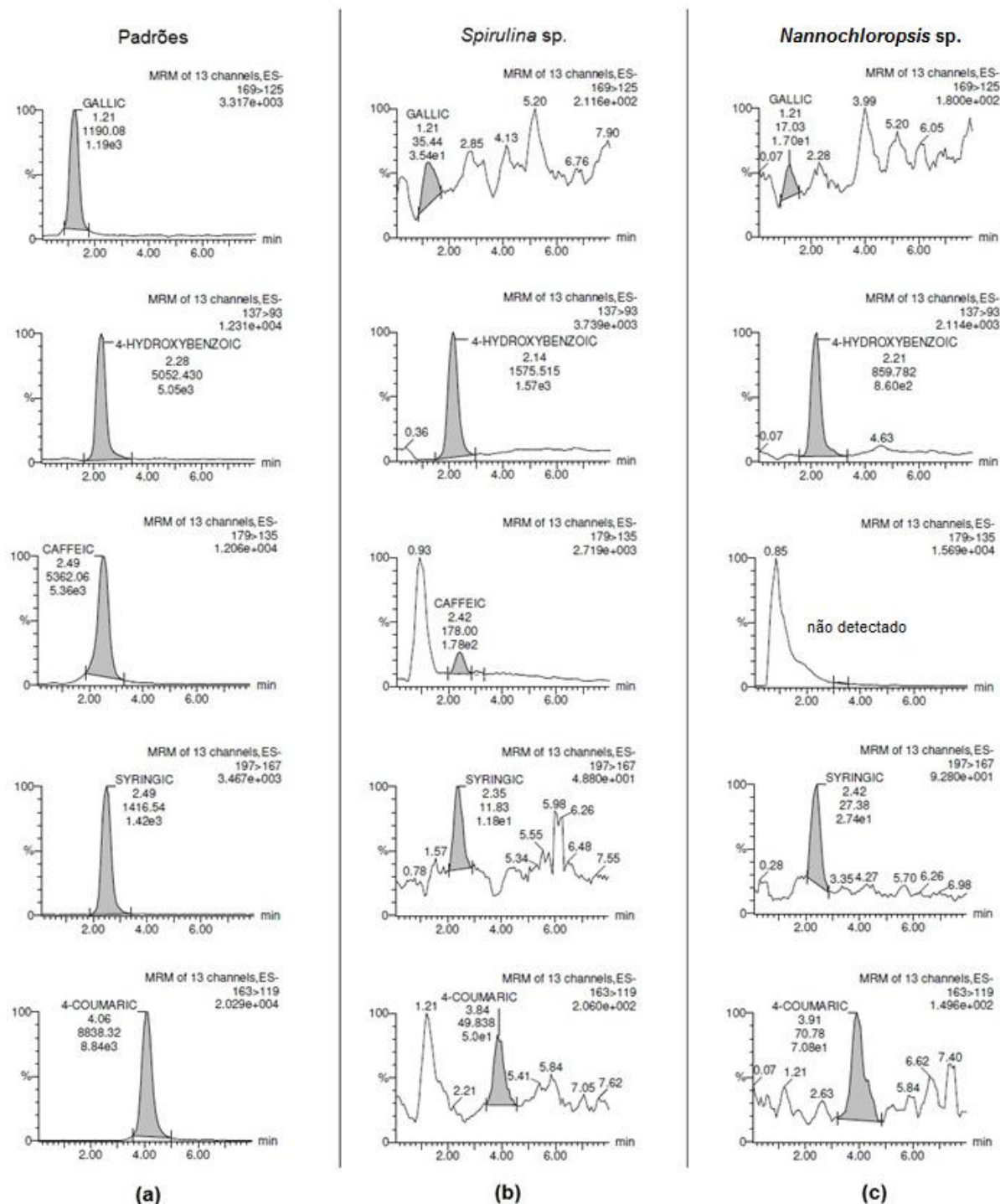


Figura 2 - Exemplos de cromatogramas (LC-ESI-MS/MS) dos ácidos fenólicos solúveis em metanol: padrões (a); (b) *Spirulina* sp. (c) *Nannochloropsis* sp.



Alguns ácidos fenólicos têm atividades biológicas definidas, tais como atividade antiinflamatória e antimicrobiana (ácido gálico) (RAVN et al., 1989) e efeito antifúngico (ácido caféico) (FERNANDEZ-PINTO et al., 2008). O principal composto fenólico encontrado nos extratos aquosos das microalgas foi o ácido clorogênico, cuja atividade

antioxidante e capacidade de inibir a mutagenicidade promovida por compostos químicos já foram demonstradas por Marinova, Toneva e Yanishlieva (2009) e Rakshit et al. (2010).

Tabela 4 - Composição de ácidos fenólicos [$\mu\text{g g}^{-1}$ (CV%)] presentes em *Spirulina* sp. e *Nannochloropsis* sp. e conteúdo de compostos fenólicos contidos nos extratos alcoólicos.

Microalga	Ácido fenólico	Solúvel em metanol	Solúvel em etanol	Ligados
<i>Spirulina</i> sp.	Gálico	1,7 (2,8)	-	-
	Protocatecóico	16,3 (0,7)	-	-
	Clorogênico	585,2 (2,4)	648,1 (0,8)	4,6 (0,6)
	Hidroxibenzóico	24,6 (3,2)	-	11,8 (8,1)
	Siríngico	-	-	4,3 (1,8)
	Vanilina	-	33,7 (2,8)	3,0 (0,7)
	Total HPLC-UV	627,8 (2,3) ^b	681,9 (1,8) ^b	23,6 (2,8) ^b
	Total espectrofotômetro	1725,2 (9,5) ^a	2997,5 (4,9) ^a	499,2 (5,3) ^a
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Gálico	86,6 (3,5)	-	-
	Protocatecóico	27,0 (2,3)	11,8 (4,0)	-
	Clorogênico	489,5 (2,8)	776,7 (2,7)	7,2 (2,1)
	Hidroxibenzóico	26,8 (1,4)	21,2 (7,8)	21,6 (3,9)
	Caféico	-	64,9 (7,1)	8,2 (3,7)
	Siríngico	7,6 (4,6)	10,1 (2,8)	19,1 (4,0)
	Vanilina	3,4 (2,7)	5,3 (1,2)	8,2 (0,4)
	Cumárico	-	-	2,0 (0,8)
	Ferúlico	0,3 (3,4)	-	-
	Total HPLC-UV	641,2 (3,0) ^b	890,0 (4,3) ^b	66,3 (2,5) ^b
	Total espectrofotômetro	1629,6 (6,6) ^a	17136,9 (16,3) ^a	944,8 (14,2) ^a

Letras diferentes entre linhas (para cada microalga) indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.2 ATIVIDADE INIBIDORA DE RADICAIS LIVRES E DE ENZIMA OXIDO-REDUTASE

A alta diversidade do perfil de ácidos fenólicos encontrados nos extratos metanólicos das microalgas, a simplicidade do método de extração e resultados de testes

preliminares, fizeram com que esta fração fosse escolhida para o estudo da capacidade inibitória de processos enzimáticos oxidativos. As atividades antioxidantes foram determinadas pela capacidade de captura do radical ABTS^+ em três concentrações dos extratos metanólicos e de misturas sintéticas. Em todos os casos, os extratos fenólicos apresentaram porcentagem de inibição estatisticamente maior ($p < 0,05$) do que a mistura equivalente feita de acordo com padrões comerciais (misturas sintéticas) (Tabela 5). A utilização de concentrações crescentes de compostos fenólicos permitiu estimar a sua IC_{50} para capturar o radical ABTS .

Tabela 5 - Inibição específica do radical ABTS^+ [$\% \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}_{\text{fenol}}$ (CV%)]; do radical DPPH [$\% \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}_{\text{fenol}}$ (CV%)]; e das atividades enzimáticas da peroxidase [$\% \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}_{\text{fenol}}$ (CV%)] e da α -amilase [$\% \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}_{\text{fenol}}$ (CV%)] por extratos fenólicos de microalgas naturais e misturas sintéticas.

Compostos fenólicos ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	<i>Spirulina</i> sp.	<i>Spirulina</i> Sintética	<i>Nannochloropsis</i> sp.	<i>Nannochloropsis</i> sp. Sintética
Inibição do ABTS ($\% \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}_{\text{fenol}}$, CV%)				
3,0	1,15 (7,8) ^b	0,40 (9,3) ^d	1,73 (9,2) ^a	0,72 (4,4) ^c
5,0	0,96 (2,7) ^b	0,40 (7,3) ^d	1,33 (10,1) ^a	0,68 (2,8) ^c
10,0	0,93 (7,7) ^a	0,35 (5,7) ^c	0,95 (12,3) ^a	0,62 (1,0) ^b
Regressão linear	$y = 5,1269x + 4,5282$	$y = 1,8983x + 1,941$	$y = 3,6239x + 21,367$	$y = 3,4845x + 2,7872$
IC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	9,0	25	8,0	14
Inibição do DPPH ($\% \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}_{\text{fenol}}$, CV%)				
Tempo (min)				
30	0,003 (20,7) ^c	0,014 (2,2) ^a	0,026 (12,0) ^b	0,028 (7,5) ^a
60	0,006 (5,3) ^b	0,015 (1,9) ^a	0,015 (3,5) ^a	0,015 (5,5) ^a
90	0,007 (3,5) ^b	0,014 (1,1) ^{ab}	0,011 (10,1) ^a	0,010 (7,4) ^{ab}
120	0,007 (1,6) ^b	0,013 (1,0) ^{ab}	0,010 (11,7) ^a	0,008 (85) ^{ab}
150	0,007 (0,8) ^b	0,012 (0,8) ^{ab}	0,009 (12,9) ^a	0,007 (12,4) ^b
180	0,007 (1,3) ^{ab}	0,013 (0,0) ^{ab}	0,008 (15,8) ^a	0,006 (14,0) ^b
Inibição da atividade da peroxidase ($\% \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}_{\text{fenol}}$, CV%)				
Tempo (min)				
10	0,49 (1,5) ^b	0,49 (2,8) ^b	0,59 (5,1) ^a	0,45 (9,7) ^b
20	0,36 (3,7) ^a	0,39 (2,4) ^a	0,39 (3,0) ^a	0,37 (1,7) ^a
30	0,27 (0,6) ^a	0,28 (0,6) ^a	0,28 (2,0) ^a	0,28 (0,3) ^a
Inibição da atividade da α -amilase ($\% \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}_{\text{fenol}}$, CV%)				
	0,075 (0,7) ^a	0,012 (10,8) ^b	0,010 (4,9) ^b	NI

Para cada método, médias seguidas da mesma letra na mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). NI – não inibiu a enzima.

Os resultados da determinação da atividade inibidora dos extratos fenólicos foram expressos como atividade específica (considerando o conteúdo deles na reação) para proporcionar melhor comparação da eficiência da ação deles para cada tipo de inibição de processo oxidativo.

A maior capacidade inibitória do ABTS foi encontrada nos extratos metanólicos naturais de ambas as microalgas: 1,2 e 1,7% $\text{min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ para *Spirulina* sp. e *Nannochloropsis* sp., respectivamente. As três concentrações do extrato natural de *Nannochloropsis* sp. apresentaram capacidade significativamente maior para inibir o ABTS. Os valores de IC_{50} obtidos pela regressão linear dos dados mostraram que a concentração mais baixa necessária para capturar 50% do radical ABTS foi a do extrato natural de *Nannochloropsis* sp. ($8,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), cuja mistura sintética também foi a mais eficiente ($14 \mu\text{g mL}^{-1}$). Ficou demonstrado que o potencial antioxidante de extratos fenólicos obtidos com metanol é determinado pela sinergia dos ácidos fenólicos presentes com outros fenóis e espécies químicas extraíveis a partir deste solvente. Portanto, purificar um extrato natural ou elaborar misturas sintéticas apenas com um grupo de fenóis pode não ser a melhor alternativa para aplicar agentes redutores em formulações alimentares ou farmacêuticas (CUSTÓDIO et al. 2012; HERRERO et al. 2005; PATRAS et al. 2011; QUIDEAU et al. 2011).

O DPPH é um radical estável com baixas taxas de deterioração e reatividade para a maioria dos compostos encontrados em um sistema biológico. Apenas os agentes redutores fortes são capazes de reagir estequiometricamente com este tipo de radicais (FADDA et al., 2014). No intervalo de 180 min foi verificada a estabilidade do poder de redução de todos os extratos sobre DPPH (Tabela 5), sendo que o extrato natural da *Spirulina* sp. se destacou, apresentando valor constante de inibição de 90 a 180 min ($0,007 \% \text{min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}_{\text{fenol}}$). A variação no intervalo de reação DPPH e redutor mostrou que o tempo de reação e a concentração desse radical podem influenciar a capacidade antioxidante. Ao longo do intervalo estudado, o extrato natural e as misturas sintéticas dos fenóis da *Nannochloropsis* sp. mostraram tendência a redução de seu efeito protetor, sugerindo que eles são mais adequados para aplicação em intervalos mais curtos. O efeito inibitório dos extratos fenólicos de *Nannochloropsis* sp. foi maior do que a mistura sintética equivalente. Portanto, é uma fonte de compostos antioxidantes que podem ser exploradas para proteger células e produtos em situações nas quais a inibição do processo oxidativo deve ser mais rápida.

O processo oxidativo ocorre em três fases distintas: iniciação (remoção de um hidrogênio da molécula, com a consequente formação de radicais livres); propagação (os

radicais livres formados continuam se combinando com O₂, formando mais radicais, por se tratar de uma reação em cadeia, esta fase pode ocorrer centenas de vezes); e terminação (os radicais livres reagem entre si, formando novos compostos não reativos) (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Compostos com atividade antioxidante podem atuar em diferentes fases do processo oxidativo. Os resultados das determinações da inibição dos radicais ABTS e DPPH mostram que os extratos fenólicos das microalgas podem inibir a fase de propagação, pois a redução se manteve em curtos intervalos de tempo, indicando que os extratos seguiram com sua capacidade de captura de radical, removendo a reação em cadeia.

Tendo em vista que é importante conhecer o potencial pró-oxidante dos extratos, foi avaliado o seu efeito inibitório sobre a atividade enzimática específica da peroxidase. Esta enzima atua na redução de compostos de caráter fenólico (CARDINALI et al., 2011; DEVAIAH; SHETTY, 2009) na presença de peróxido de hidrogênio, produzindo quinonas. Nas células, esta enzima participa de mecanismos de defesa, mas também pode levar ao estresse oxidativo. Cabe ressaltar que poucos estudos determinaram o papel inibitório dos compostos fenólicos nos processos oxidativos que são desencadeados por enzimas, principalmente a peroxidase. Neste contexto, a inibição da peroxidase é um indício promissor de ação antioxidante porque é uma enzima que aparece em células de diferentes espécies. Portanto, a medição de sua atividade na presença de extratos fenólicos permite inferir sua ação sobre mecanismos de defesa celular.

O melhor efeito para inibição de peroxidase foi verificado nos extratos fenólicos naturais de *Nannochloropsis* sp., que diferiu estatisticamente dos demais em 10 min ($p < 0,05$).

3.3 INIBIÇÃO DE α -AMILASE

O estudo da inibição da enzima α -amilase é importante na engenharia genética vegetal porque os compostos inibitórios são encontrados naturalmente nas plantas, desempenhando papel no controle do acúmulo e uso de carboidratos, bem como na proteção contra ataques de patógenos, principalmente fungos e insetos (FRANCO et al., 2010; PAGNUSSATT et al., 2012). Assim, a atividade inibidora de compostos nesta enzima pode ser utilizada como indicador de eficiência antifúngica. Neste estudo, a atividade inibitória da α -amilase pelos extratos de microalgas pode constituir um mecanismo de defesa natural das microalgas contra ataques fúngicos, sendo que esse potencial foi estimado empregando amilase fúngica. De acordo com os resultados da Tabela 5, entre os diferentes extratos

estudados, o natural da *Spirulina* sp. teve maior efeito sobre a redução da atividade da α -amilase ($0,075\% \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$) e diferiu estatisticamente dos demais extratos ($p < 0,05$). A mistura sintética dos ácidos fenólicos desta microalga teve efeito de redução igual a $0,012\% \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$. No caso da *Nannochloropsis* sp., o extrato natural levou à redução de $0,010\% \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ na atividade desta enzima.

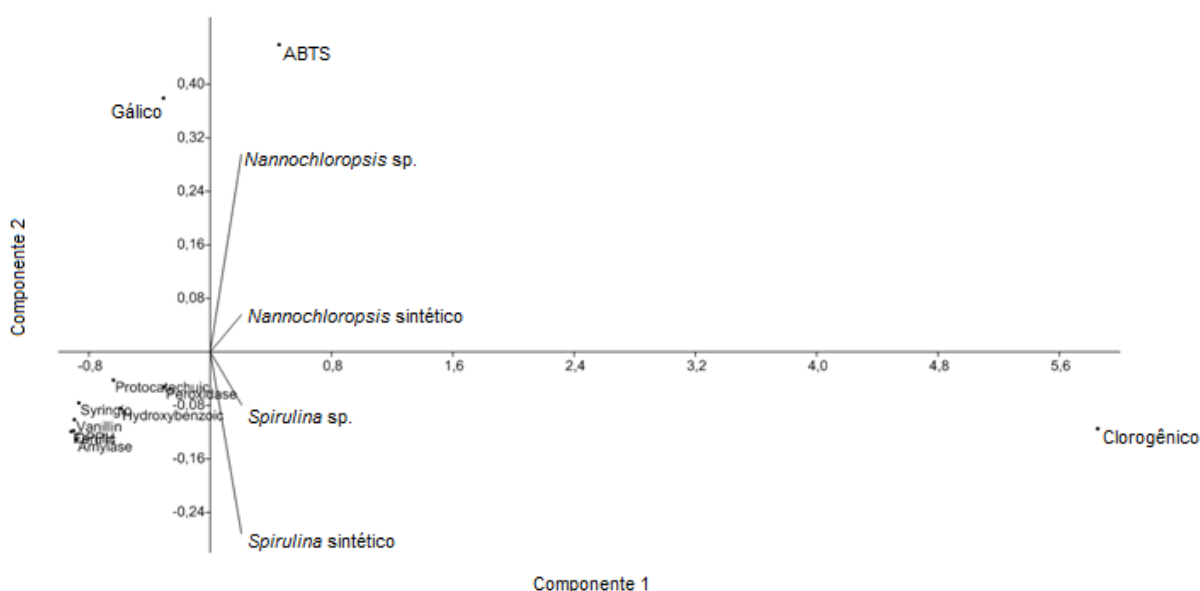
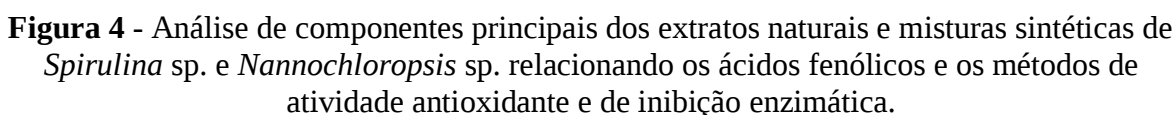
A atividade inibitória da amilase a partir de compostos fenólicos de microalgas mostra que a sua aplicação contra a contaminação por fungos no campo ou ao longo da cadeia de produção de grãos é viável. A produção de compostos de microalgas com efeitos inibitórios de amilases não tem sido investigada. Portanto, o presente estudo é pioneiro e pode contribuir para inferir a atividade antifúngica de extratos fenólicos de microalgas, uma vez que as microalgas sobrevivem em ambientes onde elas competem com fungos (CUSTÓDIO et al., 2012; MORAIS et al., 2012).

3.4 CORRELAÇÃO ENTRE OS EFEITOS INIBIDORES

A análise da eficiência dos extratos como antioxidantes em diferentes experimentos (Figura 3) mostrou que os extratos naturais têm melhor desempenho para capturar o radical ABTS, apesar da grande variabilidade demonstrada pelo desvio padrão dos resultados na figura, por se tratar de um radical que está sendo formado constantemente no meio reacional, a repetibilidade dos experimentos se torna menor, mas sem retirar o mérito de inibição dos extratos. A eficiência das misturas sintéticas foi similar à de extratos naturais quanto à captura do radical DPPH e inibição da enzima peroxidase. O extrato natural da *Spirulina* sp. apresentou maior porcentagem de inibição específica média para α -amilase do que a de *Nannochloropsis* sp. Ambos os extratos de ácidos fenólicos de microalgas têm atividade antioxidante e podem inibir a α -amilase fúngica.

Considerando a concentração de todos os ácidos fenólicos identificados nos extratos e as percentagens de inibição resultantes dos diferentes experimentos utilizados para cada extrato, a análise dos componentes principais mostrou que nas condições empregadas não havia correlação entre a ação protetora do processo oxidativo para ambas as microalgas em estudo (Figura 4), uma vez que forma-se um ângulo de cerca de 90° entre as posições dos vetores dos extratos de *Spirulina* sp. *Nannochloropsis* sp., bem como nas misturas sintéticas de *Spirulina* sp. e *Nannochloropsis* sp. Dentre os ácidos fenólicos identificados, o ácido clorogênico foi o que melhor explicou o efeito antioxidante dos extratos de *Spirulina* sp.,

Figura 3 - Comparação da inibição específica média resultante da aplicação dos extratos fenólicos (% min⁻¹ µg⁻¹) nos diferentes experimentos.



4 CONCLUSÃO

A capacidade promissora de extratos de microalgas como protetores da degradação hidrolítica e oxidativa foi demonstrada. A enzima α -amilase teve a sua atividade reduzida em $0,075\% \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ pelo extrato natural de *Spirulina* sp e os extratos metanólicos naturais e as misturas sintéticas inibiram a enzima peroxidase ($0,4\% \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$), estes resultados servem como indicativo da atividade antifúngica e antimocotoxigênica dos extratos de microalgas. O extrato natural e a mistura sintética de *Nannochloropsis* sp. se destacaram na inibição do ABTS. O principal ácido fenólico nos extratos metanólicos de *Spirulina* sp. e *Nannochloropsis* sp. foi o ácido clorogênico, representando 93 e 76%, respectivamente, sendo que a concentração deste ácido, dentre aqueles que foram identificados, foi o que melhor explicou o efeito antioxidante dos extratos de *Spirulina* sp. Os resultados podem ser utilizados para estudar a aplicação destes extratos na cadeia alimentar, desde o campo, ou na formulação de cosméticos e medicamentos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, F.; FANNING, K.; NETZEL, M.; TURNER, W.; LI, Y.; SCHENK, P. M. Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters. **Food Chemistry**, v. 165, p. 300-306, 2014.

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

ASPÉ, E.; FERNÁNDEZ, K. The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus radita* Bark. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 838-844, 2011.

BANSKOTA, A. H.; STEFANOVA, R.; GALLANT, P.; MCGINN, P. J. Mono- and digalactosyldiacylglycerols: potent nitric oxide inhibitors from the marine microalga *Nannochloropsis granulate*. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, p. 349-357, 2012.

BASKARAN, R.; PULLENCHERI, D.; SOMASUNDARAM, R. Characterization of free, esterified and bound phenolics in custard apple (*Annona squamosa* L) fruit pulp by UPLC-ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 82, p. 121-127, 2016.

BEMVENUTI, R. H. **Inibição de linhagens do complexo *Fusarium graminearum* por compostos naturais e sintéticos**. 2014. 176f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

BERRUETA, L. A.; ALONSO-SALCES, R. M.; HEBERGER, K. Supervised pattern recognition in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 196-214. 2007.

- BHOYAR, M. S.; MISHRA, G. P.; NAIK, P. K.; SRIVASTAVA, R. B. Estimation of antioxidant activity and total phenolics among natural populations of Caper (*Capparis spinosa*) leaves collected from cold arid desert of trans-Himalayas. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, p. 912-919, 2011.
- BIERHALS, V. S.; MACHADO, V.; ECHEVENGUA, W.; COSTA, J. A. V.; FURLONG, E. B. Compostos fenolicos totais, atividade antioxidante e antifúngica de multimisturas enriquecidas com a microalga *Spirulina platensis*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 68, p. 42-48, 2009.
- BORGES, L.; MORÓN-VILLARREYES, J. A.; D'OCA, M. G. M.; ABREU, P. C. Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 4449-4454, 2011.
- CARDINALI, A. T. N.; LIGORIO, A.; GIUFFRIDA, M. G.; NAPOLITANO, L.; CALIANDRO, R.; SERGIO, L.; VENERE, D. D.; LATTANZIO, V.; SONNANTE, G. Purification, biochemical characterization and cloning of a new cationic peroxidase isoenzyme from artichoke. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, p. 395-403, 2011.
- COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; REICHERT, C.; COSTA, J. A. V. Production of biomass, lipids, phenolic compounds and proteins by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1489-1493, 2007.
- CUSTÓDIO, L.; JUSTO, T.; SILVESTRE, L.; BARRADAS, A.; DUARTE, C. V.; PEREIRA, H.; BARREIRA, L.; RAUTER, A. P.; ALBERÍCIO, F.; VARELA, J. Microalgae of different phyla display antioxidant, metal chelating and acetylcholinesterase inhibitory activities. **Food Control**, v. 131, p. 134-140, 2012.
- DEVAIAH, S. P.; SHETTY, H. S. Purification of an infection-related acidic peroxidase from pearl millet seedlings. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 94, p. 119-126, 2009.
- EC. **European Commission**. Guidance Document on Residue Analytical Methods, SANCO/825/00, 2000.
- EKBATAN, S. S.; SLENO, L.; SABALLY, K.; KHAIRALLAH, J.; BEHNAM, A.; RODES, L.; PRAKASH, S.; DONNELLY, D. J.; KUBOW, S. Biotransformation of polyphenols in a dynamic multistage gastrointestinal model. **Food Chemistry**, v. 204, p. 453-462, 2016.
- FADDA, A.; SERRA, M.; MOLINU, M. G.; AZARA, E.; BARBERIS, A.; SANNA, D. Reaction time and DPPH concentration influence antioxidant activity and kinetic parameters of bioactive molecules and plant extracts in the reaction with the DPPH radical. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 35, p. 112-119, 2014.
- FERGUSON, L. R.; HARRIS, P. J. Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 8, p. 17-25, 1999.
- FERNANDEZ-PINTO, V. E.; TERMMINIELLO, V. C.; BASILICO, J. C.; RITIENI, A. Natural occurrence of nivalenol and mycotoxigenic potential of *Fusarium graminearum* strains in wheat affected by head blight in Argentina. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 157-162, 2008.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE-STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

FRANCO, O. L.; RIGDEN, D. J.; MELO, F. R.; BLOCH, J. R. C.; SILVA, C. P.; GROSSI-DESÁ, M. F. Activity of wheat α -amylase inhibitors towards bruchid α -amylases and structural explanation of observed specificities. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 2166-2173, 2000.

GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Kinetics deoxynivalenol degradation by *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae* in submerged fermentation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 710-714, 2010.

GARDA-BUFFON, J.; BARAJ, E.; BADIALE-FURLONG, E. Effect of deoxynivalenol and T-2 toxin in malt amylase activity. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 505-511, 2010.

GRUZ, J.; NOVÁK, O.; STRNAD, M. Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 111, p. 789-894, 2008.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. L.; CHANLEY, M. H. (eds) **Culture of Marine Invertebrate Animals**, Plenum, New York, p. 29-60, 1975.

GUSCHINA, I.A.; HARWOOD, J.L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. **Progress in Lipid Research**, v.45(2), p.160-186, 2006.

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.

IUPAC. **International Union of Pure and Applied Chemistry**. Guidelines for calibration in analytical chemistry. *Pure & Applied Chemistry*, v. 70, n.4, p. 993-1014, 1998.

JIA, Z.; DUMONT, M. J.; ORSAT, V. Encapsulation of phenolic compounds present in plants using protein matrices. **Food Bioscience**, v. 15, p. 87-104, 2016.

KHOZIN-GOLDBERG, I.; SHRESTHA, P.; COHEN, Z. Mobilization of arachidonyl moieties from triacylglycerols into chloroplastic lipids following recovery from nitrogen starvation of the microalga *Parietochloris incisa*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1738(1e3), p. 63-71, 2005.

KLEJDUS, B.; KOPECKÝ, J.; BENESOVÁ, L.; VACEK, 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, n.5, p. 763-771, 2009.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, M. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MAADANE, A.; MERGHOUB, N.; AINANE, T.; ARROUSSI, H.; BENHIMA, R.; AMZAZI, S.; BAKRI, Y.; WAHBY, I. Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: Pufa profiles, carotenoids and phenolic content. **Journal of Biotechnology**, v. 215, p. 13-19, 2015.

MARINOVA, E. M.; TONEVA, A.; YANISHLIEVA, N. Comparison of the antioxidative properties of caffeic and chlorogenic acids. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1498-1502, 2009.

MENDES, G. L.; PAGNUSSATT, F. A.; BRETANHA, C. C.; BADIALE-FURLONG, E. α -amylase inhibitors from wheat against development and toxigenic potential of *Fusarium verticillioides*. **Cereal Chemistry**, v. 92, p. 611-616, 2015.

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

MIN, B.; GU, L.; MCCLUNG, A. M.; BERGMAN, C. J.; CHEN, M. H. Free and bound total phenolic concentrations, antioxidant capacities, and profiles of proanthocyanidins and anthocyanins in whole grain rice (*Oryza sativa*, L.) of different bran colours. **Food Chemistry**, v. 133, p. 715-722, 2012.

MOKRANI, A.; MADANI, K. Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. **Separation and Purification Technology**, v. 162, p. 68-76, 2016.

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.

ONOFREJOVÁ, L.; VASICKOVÁ, J.; KLEJDUS, B.; STRATIL, P.; MISURCOVÁ, L.; KRÁČMAR, S.; KOPECKÝ, J.; VACEK, J. Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 2, p. 464-470, 2010.

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

PAGNUSSATT, F. A.; MEZA, S. L. R.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Procedure to determine enzyme inhibitors activity in cereal seeds. **Journal of Agricultural Science**, v. 4, p. 85-92, 2012.

PARNIAKOV, O.; APICELLA, E.; KOUBAA, M.; BARBA, F. J.; GRIMI, N.; LEOVKA, N.; PATARO, G.; FERRARI, G.; VOROBIEV, E. Ultrasound-assisted green solvent extraction of high-added value compounds from microalgae *Nannochloropsis* spp. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 262-267, 2015.

PATRAS, A.; BRUNTON, N. P.; DOWNEY, G.; RAWSON, A.; WARRINER, K.; GERNIGON, G. Application of principal component and hierarchical cluster analysis to classify fruits and vegetables commonly consumed in Ireland based on *in vitro* antioxidant activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 250-256, 2011.

QUIDEAU, S.; DEFFIEUX, D.; DOUAT-CASASSUS, C.; POUYÉGU, L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, p. 586-621, 2011.

RAKSHIT, S.; MANDAL, L.; PAL, B. C.; BAGCHI, J.; BISWAS, N.; CHAUDHURI, J.; CHOWDHURY, A. A.; MANNA, A.; CHAUDHURI, U.; KONAR, A.; MUKHERJEE, T.; JAISANKAR, P.; BANDYOPADHYAY, S. Involvement of ROS in chlorogenic acid-induced apoptosis of Bcr-Abl⁺ CML cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, p. 1662-1675, 2010.

RASHIDINEJAD, A.; BIRCH, E. J.; EVERETT, D. W. Antioxidant activity and recovery of green tea catechins in full-fat cheese following gastrointestinal simulated digestion. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 48, p. 13-24, 2016.

RAVN, H.; ANDARY, C.; KAVACS, G.; MOLGAARD, P. Caffeic acid as *in vitro* inhibitors of plant pathogenic bacteria and fungi. **Biochemistry Systematics and Ecology**, v. 17, p. 174-184, 1989.

ROMANO, I.; BELLITTI, R.; NICOLAUS, B.; LICIA, L. M.; MANCA, M. C.; PAGNOTTA, E.; GAMBACORTA, A. Lipid profile: A useful chemotaxonomic marker for classification of a new cyanobacterium in *Spirulina* genus. **Phytochemistry**, v. 54, p. 289-294, 2000.

SANTOS, J. S.; DEOLINDO, C. T. P.; ESMERINO, L. A.; GENOVESE, M. I.; FUJITA, A.; MARQUES, M. B.; ROSSO, N. D.; DAGUER, H.; VALESE, A. C.; GRANATO, D. Effects of time and extraction temperature on phenolic composition and functional properties of red rooibos (*Aspalathus linearis*). **Food Research International** (in press), v. 89, p. 476-487, 2016.

SCAGLIONI, P. T.; DE SOUZA, T. D.; SCHMIDT, C. G.; BADIALE-FURLONG, E. Availability of free and bound phenolic compounds in rice after hydrothermal treatment. **Journal of Cereal Science**, v. 60, p. 526-532, 2014.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SINGH, A.; BAJPAI, V.; KUMAR, S.; KUMAR, B.; SRIVASTAVA, M.; RAMESHKUMAR, K. B. Comparative profiling of phenolic compounds from different plant parts of six *Terminalia* species by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with chemometric analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 87, p. 236-246, 2016.

SOUZA, M. M.; PRIETO, 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, p. 1050-1058, 2011.

US-FDA. **United States Food and Drug Administration**. Guidance for Industry, Analytical Procedures and Methods Validation, 2000.

VOOREN, G. V.; LE-GRAND, F.; LEGRAND, J.; CUINÉ, S.; PELTIER, G.; PRUVOST, J. Investigation of fatty acids accumulation in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel application. **Bioresource Technology**, v. 124, p. 421-432, 2012.

**ARTIGO II - APLICAÇÃO DE EXTRATOS DE *Nannochloropsis* sp. E *Spirulina* sp.
NA INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE ISOLADOS DO COMPLEXO
*Fusarium graminearum***

RESUMO

Este estudo teve como objetivo investigar a necessidade de purificar os extratos fenólicos e de carotenoides das microalgas *Nannochloropsis* sp. e *Spirulina* sp. visando sua aplicação como antifúngico natural contra o desenvolvimento de isolados do complexo *Fusarium graminearum*. Os compostos fenólicos solúveis em metanol, em etanol e insolúveis foram extraídos de ambas as microalgas e os ácidos fenólicos determinados por HPLC-UV e confirmados por LC-MS/MS. Determinaram-se também os extratos de carotenoides por método espectrofotométrico e confirmação por HPLC-UV. Foram formuladas misturas sintéticas com os padrões comerciais, a partir da composição de ácidos fenólicos naturalmente encontrados nas microalgas. Os parâmetros indicadores de eficiência de inibição fúngica utilizados foram: taxa de crescimento micelial (cm dia^{-1}), ergosterol e glicosamina. Os extratos de carotenoides não foram eficazes para inibir os isolados do complexo *F. graminearum*. Os compostos fenólicos solúveis em metanol apresentaram a maior inibição de crescimento fúngico para todas as espécies, com as menores taxas de crescimento micelial contra isolados de *F. asiaticum*, iguais a $0,51 \text{ cm dia}^{-1}$ e $0,78 \text{ cm dia}^{-1}$ para os extratos naturais de *Spirulina* sp. e *Nannochloropsis* sp., respectivamente, enquanto que as misturas sintéticas resultaram em um crescimento médio de 1 cm dia^{-1} . As medidas de ergosterol foram altamente associadas com o crescimento do micélio ao longo do tempo ($\rho = 0,92$ para *F. graminearum* e *F. meridionale*). A elaboração das misturas sintéticas a partir dos extratos fenólicos de *Spirulina* sp. e *Nannochloropsis* sp. não melhorou a capacidade de inibir os micro-organismos, demonstrando que etapas de purificação não são necessárias.

Palavras-chave: Ergosterol. Glicosamina. Crescimento micelial. *Gibberella zeae*.

1 INTRODUÇÃO

O complexo *F. graminearum* é composto por distintas linhagens/espécies filogenéticas, a morfologia por si só não é capaz de distinguir estas diferentes espécies, sendo necessária a utilização de ferramentas de diagnóstico molecular (KONIETZNY; GREINER, 2003). Este complexo possui até hoje 16 linhagens e 15 espécies, tais como: *F. graminearum*, *F. asiaticum*, *F. meridionale*, *F. cortaderiae*, *F. austroamericanu* (AOKI et al., 2012).

Em escala global, as espécies do complexo *F. graminearum* estão entre os mais importantes patógenos fúngicos que infectam cereais, causando danos à qualidade nutricional e tecnológica dos grãos. Além disso, podem produzir micotoxinas sob certas condições (DESJARDINS, 2006). Várias práticas têm sido recomendadas para o controle de doenças em cultivos de cereais, como a giberela de trigo e cevada, causada por este complexo de espécies, incluindo o uso de cultivares resistentes e fungicidas químicos (WEGULO et al., 2015), mas a eficácia destes métodos, especialmente fungicidas, é variável (PAUL et al., 2008). Para minimizar os riscos associados ao uso de fungicidas, métodos alternativos e seguros para controlar a contaminação por *Fusarium* mostraram resultados promissores, incluindo compostos naturais extraídos de vegetais e algas (PAGNUSSATT et al., 2014), agentes de controle biológico (SCHÖNEBERG et al., 2015) e quitosana (FORRER et al., 2014).

Diversos estudos mostraram que as substâncias de origem vegetal e microbiana são inibidoras da biossíntese de componentes celulares, como o glucano, a quitina, a glicosamina, o ergosterol e as manoproteínas. Essas substâncias destroem a membrana ou parede celular, obstruem a entrada de nutrientes e inibem a ação de enzimas do metabolismo primário do patógeno fúngico (PAGNUSSATT et al., 2014).

Os compostos fenólicos estão entre a classe mais conhecida de substâncias antifúngicas, que também podem atuar como inibidor do desenvolvimento de fungos, inibidor da produção de micotoxinas e como antioxidante natural, sendo assim capazes de prevenir a deterioração oxidativa dos alimentos. Além disso, compostos fenólicos e carotenoides têm sido associados a benefícios para a saúde, devido às propriedades funcionais que impedem danos oxidativos (SOUZA et al., 2011, TIAN et al., 2012).

No entanto, os estudos sobre a purificação de extratos bioativos para melhorar seu efeito antifúngico são contraditórios quanto a sua eficiência (QUIDEAU et al., 2011). Considerando que os processos de purificação são por vezes muito caros, é importante avaliar a possibilidade de aplicação dos extratos na sua forma natural.

As microalgas são um grupo diverso dentro de procariotas e eucariotas. Além de serem usadas como fontes de energia, são capazes de produzir uma grande variedade de produtos comercialmente interessantes, tais como lipídios, óleos, açúcares, pigmentos e muitos outros compostos bioativos funcionais. Algumas microalgas são ricas em antioxidantes naturais, como carotenoides e compostos fenólicos (PLAZA et al., 2009).

A atividade antifúngica contra as espécies do complexo *F. graminearum* de compostos extraídos de *Spirulina* sp. foi recentemente demonstrada (PAGNUSSATT et al., 2014, 2016), mas são necessários mais estudos para otimizar sua formulação e maior eficácia de controle, além de explorar outras fontes de compostos bioativos, como a microalga *Nannochloropsis* sp. Esta possui capacidade de sobreviver em condições adversas e possui algumas propriedades que sugerem seu uso como antifúngico natural, apesar desta característica ainda não ter sido explorada (CUSTÓDIO et al., 2012).

Portanto, o objetivo deste estudo foi determinar a atividade antifúngica de extratos fenólicos e carotenoides de *Spirulina* sp e *Nannochloropsis* sp. com base em medidas de crescimento micelial, ergosterol e conteúdo de glicosamina para três espécies do complexo *F. graminearum* que comumente contaminam o cultivo de cereais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ISOLADOS FÚNGICOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Três isolados de espécies do complexo *F. graminearum* que representam as espécies mais comuns (*F. graminearum*, *F. meridionale* e *F. asiaticum*) infectante de trigo, cevada e arroz no sul do Brasil foram selecionados a partir de estudos prévios e identificados com precisão por métodos moleculares (DEL PONTE et al., 2015; GOMES et al., 2015). Os isolados foram depositados na coleção micológica de Lavras (CML - Coleção Micológica de Lavras) e estão disponíveis mediante solicitação com os seguintes códigos: CML 3607 (*F. graminearum*), CML 3608 (*F. meridionale*) e CML 3604 (*F. asiaticum*). Os fungos foram cultivados em Ágar *Spezieller Nährstoffarmer* (SNA) a 25 °C até indução da esporulação e mantidas a 4 °C em SNA, afim de armazenar os isolados de maneira estável por longos períodos. Para obtenção dos discos de micélio utilizados como inóculo, os isolados foram cultivados em meio de ágar batata dextrose (ABD) durante sete dias (PAGNUSSATT et al., 2013).

2.2 PRODUÇÃO DAS BIOMASSAS DE MICROALGAS

A *Spirulina* sp. foi isolada e cultivada em H₂O da Lagoa Mangueira suplementada com 20% (v/v) de meio Zarrouk. A planta-piloto que produziu a microalga está localizada próxima à costa da Lagoa da Mangueira (33°30'13"S e 53°08'59"O) sendo constituída por tanques abertos de diferentes dimensões e volumes, forrados com fibra de vidro e coberto por estrutura de estufa com filme de polietileno transparente. Sofrendo agitação por pás rotativas a 18 rpm, 24 h por dia (MORAIS; COSTA, 2007).

A biomassa de *Nannochloropsis* sp. foi proveniente da coleção do Laboratório de Ecologia de Fitoplâncton e Micro-organismos Aquáticos (FURG) (nome de catálogo NANN OCUL-1). As células foram cultivadas em culturas em meio f/2 (GUILLARD, 1975), com salinidade 28, a 20 °C, com 40 μmol de fótons $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ de intensidade de luz e 12-12 h de fotoperíodo claro / escuro. As culturas foram constantemente agitadas para obter a aeração necessária (BORGES et al., 2011).

A biomassa das microalgas foi coletada durante a fase de crescimento estacionária (verificada através da constância da densidade celular), garantindo elevado teor protéico e lipídico e evitando o acúmulo excessivo de matéria orgânica nos tanques. A colheita nesta fase sugere que a produção de compostos com atividade biológica ocorreu e eles ainda apresentam-se ativos. Esta biomassa úmida foi centrifugada, seca em secador com circulação de ar a 60 °C durante 10 h e moída até 32 mesh para que pudesse ser utilizada nos experimentos.

2.3 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

A extração dos compostos fenólicos solúveis em metanol, solúveis em etanol e ligados e a identificação dos ácidos fenólicos em ambas as microalgas foi realizada conforme metodologias descritas no Artigo I (PAGNUSSATT et al., 2014; SCAGLIONI et al., 2014).

2.4 DETERMINAÇÃO DOS CAROTENOIDES

Os carotenoides foram extraídos das biomassas de *Spirulina* sp. e *Nannochloropsis* sp. com acetona P.A. na razão de 1:8 (m/v). A mistura foi homogeneizada utilizando agitador orbital a 200 rpm durante 60 min no escuro. Após filtração, o resíduo foi

lavado com 20 mL de acetona por três vezes. Os extratos foram particionados com 15 mL de éter de petróleo e água destilada e, após separação, a fase orgânica foi submetida a três séries de extração. As fases orgânicas foram reunidas e lavadas mais quatro vezes com água. Em seguida, o volume foi completo para 100 mL com éter de petróleo.

Os carotenoides totais nos extratos foram determinados como β -caroteno em espectrofotômetro a 450 nm. Os valores foram definidos pela Equação 1, utilizando o coeficiente de absorvidade específico em éter de petróleo ($2592 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), onde C = concentração de carotenoides total ($\mu\text{g g}^{-1}$); A = absorvância; V = volume (mL); m = massa de biomassa (g); $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ = absorvidade específica (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

$$C = \frac{A \cdot V \cdot 10^6}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot 100 \cdot m} \quad (1)$$

As concentrações de astaxantina e β -caroteno foram estimadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu, Kyoto, Japão), com um sistema de bombas LC-20AT, um degaseificador DGU 20A5, um controlador CBM-20A, uma pistola manual com cabo de 20 μL e um sistema de detecção espectrofotométrica SPD-20A a 450 nm. O controle do instrumento e a aquisição dos dados foram feitos usando o software LC Solution. As determinações foram realizadas utilizando coluna reversa Discovery Bio Wide Pore C18, 10 μm (25 cm x 4,6 mm), à temperatura ambiente (20 °C) com fase móvel de acetonitrila(A):metanol(B):acetato de etila(C) em modo gradiente (70% (A): 30% (B): 0% (C) até 5 min; 80% (A): 10% (B): 10% (C) até 6 min; 30% (A): 0% (B): 70% (C) até 7 min; 30% (A): 20% (B): 30% (C) até 10 min; reiniciando as condições iniciais até 17 min) (CIPOLATTI et al., 2015) a uma taxa de fluxo de 1 mL min^{-1} e tempo de corrida total de 17 min com linearidade entre 0,1 e $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ para astaxantina e β -caroteno.

2.5 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS FENÓLICOS E CAROTENOIDES

O primeiro experimento consistiu em um fatorial $2 \times 4 \times 3$: duas microalgas (*Spirulina* sp. e *Nannochloropsis* sp.), quatro tipos de extratos aquosos e três espécies de *Fusarium*. Todos os testes foram realizados em quintuplicata.

Os extratos aquosos foram obtidos a partir dos resíduos secos das frações fenólicas solúveis em metanol, em etanol, fenóis ligados e carotenoides, os quais foram

ressuspensos em água estéril e submetidos a filtração à vácuo em condições assépticas. Foi incluído um tratamento controle, preparado utilizando água estéril no lugar do extrato das microalgas, para verificar o desenvolvimento do fungo sem qualquer restrição.

Os diferentes extratos foram adicionados ao meio de cultura ABD a 35-40 °C e vertidos em placas de Petri (10 cm de diâmetro). A inoculação foi realizada após solidificação do meio. Um disco (1,1 mm de diâmetro) de micélio ativo foi retirado da borda da cultura dos fungos após sete dias de cultivo e foi colocado no centro de cada placa de Petri, que foram incubadas a 25 °C, fotoperíodo claro / escuro de 12-12 h (Quimis, Q216F20M, São Paulo, Brasil) (PAGNUSSATT et al., 2013), com a finalidade de reproduzir as condições reais onde ocorre a infecção por *Fusarium*.

A eficácia dos tratamentos foi avaliada diariamente, durante sete dias, medindo o diâmetro do desenvolvimento da hifa ortogonalmente. A taxa de crescimento micelial foi obtida através da divisão do diâmetro final por seis dias, quando o crescimento ainda estava ativo.

No segundo experimento, a atividade de inibição dos extratos das microalgas foi testada com cinco concentrações diferentes, correspondendo a 10, 20, 25, 30 e 40% do meio contendo ABD. A percentagem de inibição do desenvolvimento fúngico foi calculada de acordo com Nguefack et al. (2004) conforme Equação 2, sendo que o controle não recebeu qualquer extrato.

$$\% \text{ Inibição} = 100 \cdot \frac{(\text{controle} - \text{tratamento})}{\text{controle}} \quad (2)$$

A metade da concentração eficaz máxima (EC₅₀), ou a que resultou em 50% de inibição do desenvolvimento fúngico em relação aos grupos controle, foi determinada através de regressão linear entre as concentrações e as percentagens de inibição.

O terceiro experimento foi composto por um fatorial 2x2x3: duas microalgas (*Spirulina* sp. e *Nannochloropsis* sp.), duas formulações do extrato (sintético ou natural) e três espécies fúngicas de *Fusarium*.

As misturas sintéticas foram formuladas utilizando padrões purificados dos ácidos fenólicos identificados, na mesma proporção e concentração encontradas nas biomassas das microalgas, para permitir a comparação. As medidas de crescimento radial dos micélios foram obtidas como descrito anteriormente, assim como a taxa de crescimento micelial. No sétimo dia de crescimento as placas foram congeladas e a biomassa foi seca a 60 °C (Quimis,

Q314M242, São Paulo, Brasil) por 4 h para determinar os níveis de glicosamina e ergosterol. A redução destes parâmetros foi determinada pela relação entre cada aplicação de extrato com o tratamento controle.

2.6 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE GLICOSAMINA E ERGOSTEROL

A glicosamina foi estimada a partir da biomassa fúngica seca (1 g), sendo extraída com 5 mL de HCl 6 mol L⁻¹ a 100 °C durante 40 min. O material hidrolisado foi neutralizado com NaOH 3 mol L⁻¹ e a titulação inversa foi realizada com KHSO₄ (1 g 100 mL⁻¹). O método colorimétrico foi utilizado para a determinação da glicosamina (SOUZA et al., 2011). As unidades de absorvância foram obtidas por espectrofotometria (Varian, Cary 100, Califórnia, EUA) a 530 nm e as concentrações foram estabelecidas utilizando curva padrão de glicosamina (0,01 a 0,2 g L⁻¹). As medições foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como glicosamina por mg de amostra.

O método modificado de Gutarowska e Zakowska (2009) foi utilizado para a determinação do teor de ergosterol na biomassa seca. Consistiu em misturar 0,2 g do conteúdo das placas e 10 mL de metanol em agitador orbital (Tecnal, TE-141, Erechim, Brasil) a 200 rpm durante 30 min (três vezes). O extrato metanólico foi centrifugado a 3200 g a 20 °C durante 10 min. Em seguida, a mistura foi refluxada durante 30 min e arrefeceu-se a 4 °C, para realização de quatro partições com 20 mL de hexano. A fração de hexano foi seca em evaporador rotativo (Fisatom, 801-802, Erechim, Brasil) a 60 °C.

O resíduo foi dissolvido em metanol e determinado em cromatógrafo (Shimadzu, Tóquio, Japão, CLASSE-M10A) acoplado com detector de UV e coluna de fase reversa C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm, Discovery, EUA). O HPLC-UV operou a vazão de 0,8 mL min⁻¹, a 30 °C, utilizando fase móvel de 100% de metanol durante 17 min, com detecção a 282 nm. O teor de ergosterol foi estimado por curva de calibração com padrão comercial de ergosterol com concentrações variando de 0,05 a 2,0 µg mL⁻¹ (FREITAS et al., 2016).

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A interação e os efeitos individuais dos tratamentos sobre a taxa de crescimento micelial foram testados em um modelo de análise de variância de três ou duas vias, dependendo do experimento. Não foi necessária transformação da variável de resposta, pois a normalidade e a homocedasticidade dos resíduos do modelo poderiam ser assumidas (dados

não mostrados). Os meios de tratamento foram comparados por teste de Tukey a um nível de confiança de 95%. A correlação entre as medidas diárias de crescimento micelial e ergosterol para cada tratamento foi testada com base no teste de correlação de Spearman (rho) porque a normalidade não pôde ser assumida.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 COMPOSIÇÃO DOS EXTRATOS FENÓLICOS E DE CAROTENOIDES DAS BIOMASSAS

A separação e quantificação por HPLC-UV e confirmação por LC-ESI-MS/MS mostraram que o extrato fenólico da *Spirulina* sp. solúvel em metanol continha $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de compostos fenólicos, 93% destes representado pelo ácido clorogênico e o restante continha ácido gálico (0,3%), ácido protocatecóico (2,6%) e hidroxibenzóico (3,9%). Os extratos fenólicos solúveis em etanol continham teor de ácidos fenólicos de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$: 95% representado por ácido clorogênico, mas também continham vanilina (5,0%). O extrato contendo compostos fenólicos ligados tinha $0,6 \mu\text{g mL}^{-1}$: 50% representado por ácido hidroxibenzóico, enquanto o restante continha ácidos clorogênico (19,3%), siríngico (18,2%) e vanilina (12,5%).

No que se refere a *Nannochloropsis* sp., os extratos metanólicos apresentaram compostos fenólicos de $10,2 \mu\text{g mL}^{-1}$: 76% representados pelo ácido clorogênico e os demais continham ácido gálico (13,5%), protocatecóico (4,2%), hidroxibenzóico (4,2%), vanilina (0,5%) e ferúlico (0,1%). O extrato de fenóis solúveis em etanol mostrou concentração de $10,6 \mu\text{g mL}^{-1}$: 87% representado por ácido clorogênico, mas também protocatecóico (1,3%), hidroxibenzóico (2,4%), caféico (7,3%), siríngico (1,1%) e vanilina (0,6%). O extrato de compostos fenólicos ligados continha $1,6 \mu\text{g mL}^{-1}$: 33% representado por ácido hidroxibenzóico, enquanto o restante continha clorogênico (10,8%), cafeína (12,4%), siríngico (28,8%), vanilina (12,3%) e cumárico (3,0%).

Cabe ressaltar que a família de compostos fenólicos é composta de diferentes estruturas que determinam seus efeitos biológicos, o presente estudo utilizou extrações que visam obter principalmente a fração de ácidos fenólicos, que são componentes associados à ação antimicrobiana (PAGNUSSATT et al., 2016; QUIDEAU et al., 2011). Na literatura não constam estudos aprofundados com relação a separação de compostos fenólicos solúveis em

metanol, etanol e insolúvel das microalgas avaliadas, assim como também não há estudos sobre o perfil específico e o efeito de ácidos fenólicos encontrados nestas microalgas como agentes antifúngicos.

O teor de compostos fenólicos das microalgas mostrou predominância de ácido clorogênico nos extratos fenólicos solúveis. Anteriormente, foram demonstrados os efeitos benéficos deste composto, tais como a sua atividade antioxidante e a capacidade de inibição de mutagenicidade de compostos carcinogênicos (MARINOVA; TONEVA; YANISHLIEVA, 2009; RAKSHIT et al., 2010). Além disso, o extrato de *Nannochloropsis* sp. é composto por uma maior vários ácidos fenólicos, o que pode favorecer o efeito sinérgico entre os compostos, aumentando a capacidade antifúngica do extrato (SKROZA et al., 2015).

A concentração de carotenoides determinada por espectrofotometria e expressa pelo teor de β -caroteno foi $4,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o extrato de *Spirulina* sp. e de $7,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *Nannochloropsis* sp. As concentrações de astaxantina e β -caroteno nos extratos de carotenoides foram de $0,5$ e $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o extrato de *Spirulina* sp. e $2,2$ e $6,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *Nannochloropsis* sp. Estes carotenoides têm propriedades antioxidantes que podem ter relação com a atividade antifúngica, sendo os mais encontrados em microalgas.

Estudos recentes relacionaram carotenoides em microalgas à sua capacidade antioxidante (MILLAO; UQUICHE, 2016; PALIWAL et al., 2016), demonstrando, assim, que há correlação positiva entre eles. No entanto, não existem estudos sobre a capacidade antifúngica destes compostos obtidos de microalgas. A composição dos extratos deste estudo é consistente com outros autores (NOBRE et al., 2013; SHAO et al., 2015), sugerindo que esses extratos são adequados para serem utilizados em indústrias de alimentos e/ou nutracêuticos como fontes de carotenoides com atividade funcional antioxidante.

Os compostos antioxidantes estão relacionados com a redução do estresse oxidativo que pode ser aplicável aos fungos, para reduzir o risco de manifestação de potencial toxigênico e o acúmulo de toxinas na matriz contaminada (PAGNUSSATT et al., 2013, 2014).

Goh et al. (2009) mostraram que a biodisponibilidade e a bioacessibilidade dos carotenoides de matrizes complexas são influenciadas por diversos fatores, além do teor de carotenoides. Incluem não só a maneira pela qual a matriz foi processada, mas também seu conteúdo de lipídios e fibras. Para tornar os carotenoides acessíveis para absorção, é importante a ruptura mecânica e química da matriz alimentar. Na ruptura mecânica, a área superficial, onde as enzimas digestivas atacam, aumenta e, assim, os carotenoides são mais facilmente liberados de sua matriz (MILLAO; UQUICHE, 2016). Granado-Lorencio et al.

(2007) também demonstraram que quando sucos e extratos foram avaliados, obtiveram-se maiores quantidades de formas livres (hidrólise), sugerindo que a solubilização dos substratos (em formas éster) da matriz nos meios é um fator crítico para hidrólise eficiente.

No presente estudo a extração foi realizada com solvente e agitação, que foi evaporado e o conteúdo sólido foi resolubilizado com água para a aplicação à cultura fúngica com a finalidade de avaliar seu efeito no desenvolvimento dos fungos.

3.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Os dados sobre as medidas diárias de crescimento micelial para cada espécie na presença e ausência de extratos das microalgas sugeriram que alguns tratamentos suprimiram o crescimento micelial (Figura 1). Com o uso do extrato de compostos fenólicos solúveis em etanol e nos extratos de carotenoides houve aparente efeito estimulante sobre o crescimento de micélios, em comparação com o controle não tratado.

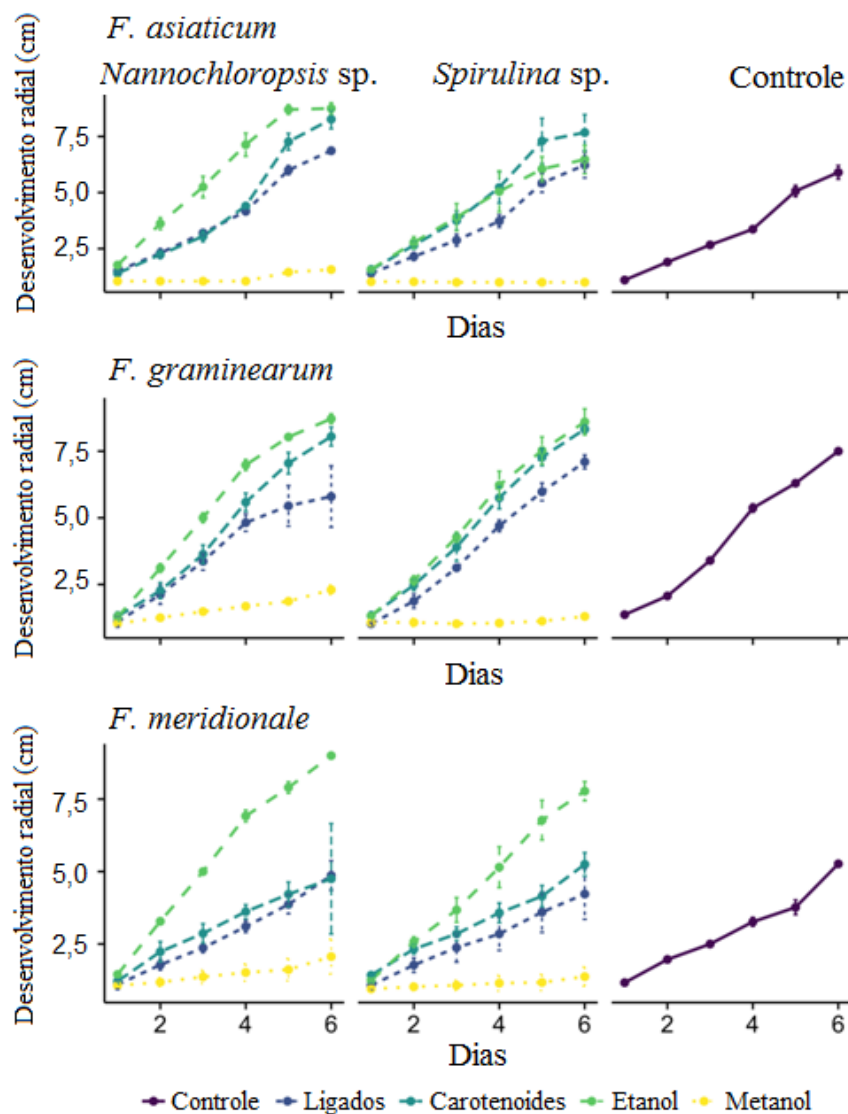
O modelo de ANOVA ajustado à taxa de crescimento micelial mostrou significância para a interação de três vias ($p < 0,05$). Dentre os tratamentos, a taxa de crescimento micelial de todas as espécies foi menor ($< 0,32 \text{ cm dia}^{-1}$ para *Spirulina* sp. e $0,21 \text{ cm dia}^{-1}$ para *Nannochloropsis* sp.) na presença dos extratos fenólicos solúveis em metanol, que diferiu significativamente ($p < 0,05$) dos outros tratamentos dentro de cada combinação de espécies fúngicas e microalgas (Tabela 1). O segundo melhor tratamento foi com os compostos fenólicos ligados (insolúvel em etanol) para ambas as microalgas.

Considerando a baixa concentração de compostos ligados nos extratos das microalgas, a dificuldade em obtê-los e o melhor efeito de inibição demonstrado pelos compostos solúveis em metanol, os valores de EC_{50} foram determinados apenas para os compostos fenólicos solúveis nesse sistema de extração. Em geral, os valores de EC_{50} foram mais baixos para extratos de *Spirulina* sp. (média de $33,9 \mu\text{g mL}^{-1}$) em comparação com a *Nannochloropsis* sp. (média de $49,6 \mu\text{g mL}^{-1}$). Entre as espécies, houve menor variabilidade nos valores de EC_{50} para o extrato de *Spirulina* sp. em comparação com os de *Nannochloropsis* sp., onde EC_{50} para *F. meridionale* foi 1,5 maior ($64,6 \mu\text{g mL}^{-1}$) do que as outras duas espécies (Tabela 2).

Foi avaliada a necessidade de purificar os extratos para melhorar o efeito inibitório. Para isso realizou-se um experimento onde padrões comerciais dos ácidos fenólicos

identificados nos extratos de microalgas (misturas sintéticas) foram avaliados quanto à sua influência na taxa de crescimento de *Fusarium* e sua produção de biomassa.

Figura 1 - Curvas do crescimento micelial das cepas do complexo *Fusarium graminearum*, isolados de cevada (*F. meridionale*), trigo (*F. graminearum*) e arroz (*F. asiaticum*), tratadas com diferentes extratos de microalgas (carotenoides, compostos fenólicos ligados, solúveis em etanol ou metanol).



As misturas sintéticas ou extratos naturais dos ácidos fenólicos solúveis em metanol afetaram diferentemente o crescimento da espécie. A interação de três vias também foi significativa ($p < 0,05$). Em geral, o crescimento micelial foi suprimido em maior magnitude quando se utilizou extrato de *Spirulina* sp. *in natura*, quando comparado com a *Nannochloropsis* sp. e as misturas sintéticas (Figura 2).

Tabela 1 - Taxa de crescimento micelial média (cm dia⁻¹) até o sexto dia de crescimento, para experimento fatorial de três vias que testa o efeito de duas microalgas, quatro formulações diferentes e três membros do complexo de espécies de *Fusarium graminearum* que causam doenças em culturas de cereais.

Tratamento	<i>F. graminearum</i>		<i>F. meridionale</i>		<i>F. asiaticum</i>	
	<i>Nannochloropsis</i>	<i>Spirulina</i>	<i>Nannochloropsis</i>	<i>Spirulina</i>	<i>Nannochloropsis</i>	<i>Spirulina</i>
	sp.	sp.	sp.	sp.	sp.	sp.
CF* ligados	0,91 ^{cA}	1,00 ^{bA}	0,64 ^{Ba}	0,60 ^{bA}	1,00 ^{cA}	0,90 ^{bA}
Extrato de carotenoides	1,18 ^{bA}	1,21 ^{aA}	0,70 ^{Ba}	0,69 ^{bA}	1,21 ^{bA}	1,22 ^{aA}
CF* solúveis em etanol	1,34 ^{aA}	1,25 ^{aA}	1,32 ^{aA}	1,13 ^{aB}	1,45 ^{aA}	1,01 ^{bB}
CF* solúveis em metanol	0,31 ^{dA}	0,19 ^{cB}	0,27 ^{Ca}	0,20 ^{cB}	0,24 ^{dA}	0,17 ^{cB}

*CF = compostos fenólicos. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha, para cada espécie fúngica, diferem estatisticamente por ANOVA seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 2 - Metade da concentração eficaz máxima (EC₅₀) (µg mL⁻¹) dos extratos fenólicos solúveis em metanol de *Spirulina* sp. e *Nannochloropsis* sp. depois de sete dias contra três isolados do complexo *F. graminearum* que causam doenças em culturas de cereais.

Isolado do complexo <i>F. graminearum</i>	Equação	EC ₅₀ extrato <i>Spirulina</i> sp.	Equação	EC ₅₀ extrato <i>Nannochloropsis</i> sp.
<i>F. meridionale</i>	y = 1,381 x	36,2	y = 0,776 x	64,6
<i>F. graminearum</i>	y = 1,481 x	33,8	y = 1,170 x	42,8
<i>F. asiaticum</i>	y = 1,577 x	31,7	y = 1,205 x	41,5

O extrato fenólico natural de *Spirulina* sp. apresentou maior efeito contra as espécies do complexo *F. graminearum* ($p < 0,05$) (Tabela 3), sendo a menor taxa de crescimento micelial 0,51 cm dia⁻¹ para o *F. asiaticum*. O extrato natural de *Nannochloropsis* sp. teve o menor valor de taxa de crescimento micelial para o *F. meridionale* e *F. asiaticum*, seguido pelo *F. graminearum*. A formulação sintética de ambas as microalgas apresentou maiores valores de taxa de crescimento micelial, estatisticamente diferentes dos extratos naturais para as três espécies.

Em relação à inibição do crescimento micelial sabe-se que os compostos fenólicos com potencial antioxidante não agem eficazmente sozinhos (SKROZA et al., 2015), mas sinergicamente, sendo coadjuvados por outros compostos encontrados na própria matriz. Por

consequente, as misturas fenólicas com atividade antioxidante não podem ser determinadas de forma eficiente a partir de dados sobre compostos individuais, devido às suas interações aleatórias. A atividade antifúngica de extratos naturais, neste estudo, mostrou maior eficiência para inibir o desenvolvimento de fungos do que as misturas sintéticas, isto pode estar relacionado à presença de compostos traços que não foram identificados com os métodos utilizados, e sugere que ao invés de utilizar operações de purificação maximizadas, maior atenção deve ser dada ao uso de técnicas de produção de biomassa de microalgas e métodos de extração que permitam o maior rendimento desses compostos, para posterior emprego como antifúngicos naturais.

Figura 2 - Curvas de crescimento micelial do complexo *Fusarium graminearum* isolados de arroz (*F. asiaticum*), trigo (*F. graminearum*) e cevada (*F. meridionale*) tratados com extratos de microalgas naturais e misturas sintéticas.

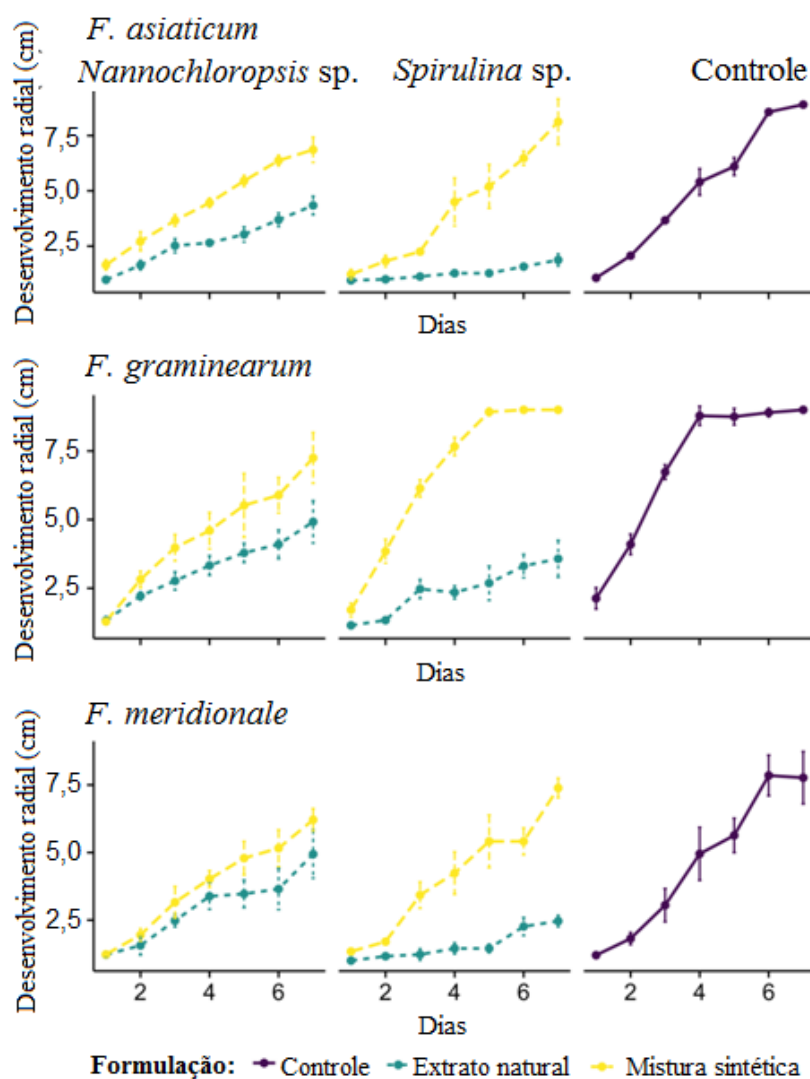


Tabela 3 - Taxa de crescimento micelial média (cm dia⁻¹) até o sexto dia de crescimento, para experimento fatorial de três vias que testa o efeito dos extratos de duas microalgas, duas formulações diferentes e três isolados do complexo *Fusarium graminearum* que causam doenças em culturas de cereais.

Tratamento	<i>F. graminearum</i>		<i>F. meridionale</i>		<i>F. asiaticum</i>	
	<i>Nannochloropsis</i>	<i>Spirulina</i>	<i>Nannochloropsis</i>	<i>Spirulina</i>	<i>Nannochloropsis</i>	<i>Spirulina</i>
	sp.	sp.	sp.	sp.	sp.	sp.
CF naturais	0,83 ^{bA}	0,74 ^{bB}	0,78 ^{bA}	0,61 ^{bB}	0,78 ^{Ba}	0,51 ^{bB}
CF sintéticos	0,99 ^{aA}	1,22 ^{aB}	0,93 ^{aA}	0,95 ^{aA}	1,03 ^{aA}	1,04 ^{aA}

*CF = compostos fenólicos. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha, para cada espécie, diferem estatisticamente por ANOVA seguido do teste de Tukey ($p < 0,05$).

Embora muitos estudos usem a medida do halo como forma quantitativa para medir o crescimento fúngico (MADONNA; VOORHEES; HADFIELD, 2001; SHUKLA et al., 2012), a medição de compostos fúngicos estruturais, como a glicosamina e o ergosterol, fornecem subsídios para entender melhor o mecanismo protetor do extrato natural e, consequentemente, a sua melhor aplicação para evitar a contaminação fúngica ao longo da cadeia alimentar.

O ergosterol mostrou ser um bom indicador do desenvolvimento fúngico devido à sua correlação com a biomassa metabolicamente ativa dos micro-organismos, permitindo monitorar as mudanças durante o crescimento fúngico (TIAN et al., 2012). Portanto, o ensaio de ergosterol é um método alternativo promissor para determinar o crescimento de fungos porque é especificamente encontrado na membrana celular destes micro-organismos e não em tecidos vegetais ou animais (MADONNA; VOORHEES; HADFIELD, 2001).

A Tabela 4 mostra a porcentagem de redução de ambos os indicadores de inibição fúngica pelos extratos naturais e pelas misturas sintéticas utilizadas na mesma proporção. O conteúdo de ergosterol foi mais afetado em todos os casos, em comparação com a glicosamina. As formulações sintéticas mostraram pequeno efeito nas concentrações de ambos os indicadores para as três espécies do complexo *F. graminearum* estudadas. As maiores inibições foram obtidas com a aplicação do extrato natural de *Nannochloropsis* sp. contra *F. asiaticum*, 93,1% e 28,6%, para a inibição do ergosterol e da glicosamina, respectivamente. O extrato fenólico natural de *Spirulina* sp. resultou em inibições de ergosterol maiores que 80% nos três isolados fúngicos, para glicosamina, este extrato apresentou capacidade de inibição apenas quando empregado contra *F. meridionale*.

Tabela 4 - Redução (%) de ergosterol e glicosamina em isolados do complexo *Fusarium graminearum* cultivados por 168 h.

Respostas	<i>F. graminearum</i>				<i>F. meridionale</i>				<i>F. asiaticum</i>			
	<i>Sp</i>	<i>Sp S</i>	<i>No</i>	<i>No S</i>	<i>Sp</i>	<i>Sp S</i>	<i>No</i>	<i>No S</i>	<i>Sp</i>	<i>Sp S</i>	<i>No</i>	<i>No S</i>
Redução de ergosterol (%)	87,3	32,9	63,4	45,5	88,1	34,9	71,1	24,7	81,5	20,4	93,1	78,1
Redução de glicosamina (%)	-	3,6	19,4	7,0	18,4	10,2	9,7	2,0	-	5,6	28,6	3,8

Sp – extrato fenólico de *Spirulina* sp.; *Sp S* – formulação sintética dos fenóis da *Spirulina* sp.; *No* – extratos fenólicos da *Nannochloropsis* sp.; *No S* – formulação sintética dos fenóis da *Nannochloropsis* sp.

A Figura 3 mostra a produção de ergosterol ao longo de sete dias, quando os isolados de *F. graminearum* foram cultivados sob diferentes condições. Os extratos naturais mostraram maiores efeitos na inibição da produção de ergosterol, principalmente no sexto dia de crescimento do halo. Os extratos foram capazes de inibir significativamente teor de ergosterol em *F. asiaticum*.

Os níveis de ergosterol foram positivamente e fortemente associados à inibição do halo micelial para todas as espécies, mas especialmente para o *F. graminearum* e *F. meridionale* ($\rho = 0,92$) (Figura 4).

A correlação entre o ergosterol e o crescimento visível pode variar de acordo com as matérias-primas em análise, no entanto, previamente foi demonstrado que o ergosterol é um marcador adequado para estimar a biomassa e a contaminação fúngica em vários materiais vegetais, como canola (PRONYK et al., 2006), uva (POREP et al., 2014), híbridos de sorgo (RAO et al., 2012), trigo, milho, cevada e arroz (STANISZ et al., 2015).

Um estudo sobre a inibição de *Rhizopus oryzae* por extratos fenólicos de *S. platensis* e *Chlorella* sp. mostrou que a produção de ergosterol foi reduzida entre 46 e 17% após oito dias, respectivamente. No mesmo estudo, no caso da glicosamina, a redução foi 54 e 17% para cada extrato de microalga, respectivamente (SOUZA et al., 2011). Pagnussatt et al. (2013) utilizaram extrato fenólico para o cultivo de linhagens de *F. graminearum* e encontraram inibição máxima de 74% para glicosamina e 44% para ergosterol, concluindo que o principal mecanismo de inibição fúngica se deve a inibição da formação da parede celular (glicosamina). Os autores acompanharam a produção de ergosterol em espectrofotômetro, enquanto que neste estudo foi utilizado método cromatográfico que é mais específico, sensível e confiável.

Figura 3 - Produção de ergosterol pelo complexo de *Fusarium graminearum*, isolado de arroz (*F. asiaticum*), trigo (*F. graminearum*) e cevada (*F. meridionale*), tratados com extratos fenólicos naturais de *Spirulina* sp. ou *Nannochloropsis* sp. e misturas sintéticas dos fenólicos presentes nas microalgas.

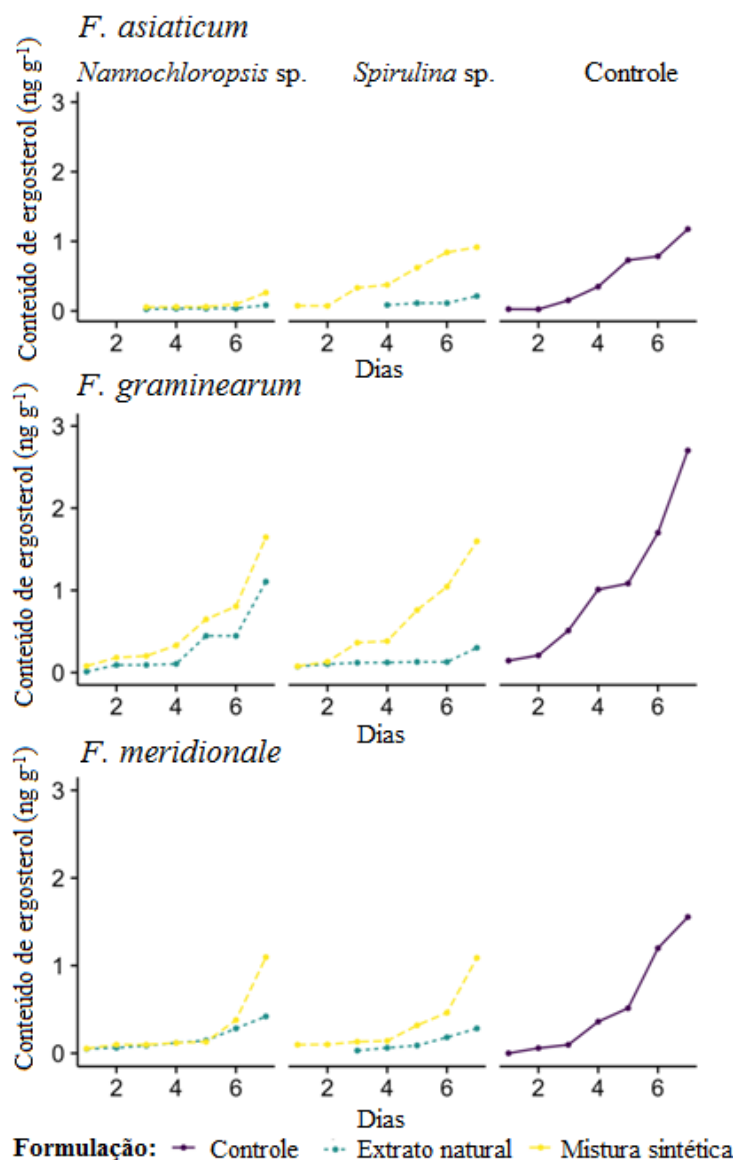
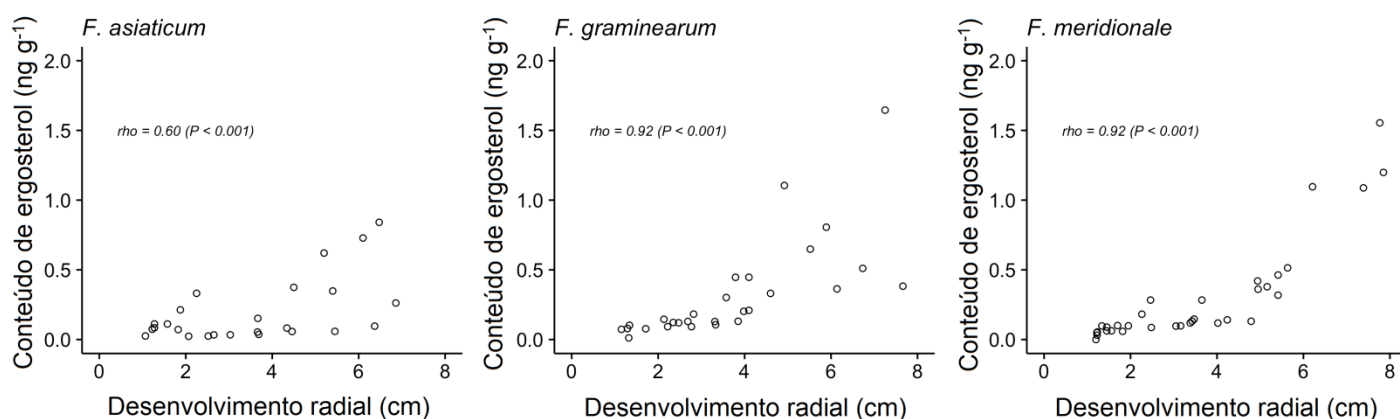


Figura 4 - Correlação da biomassa fúngica com o conteúdo de ergosterol ao longo do tempo.



Heidtmann-Bemvenuti et al. (2016) aplicaram o fungicida azoxistrobina contra a cepa de *F. graminearum* CQ244, que inibiu a produção de glicosamina em 48% e ergosterol em 15%; e Trifloxistronbina que inibiu a glicosamina em 48% e o ergosterol em 15%. Assim, o potencial antifúngico dos extratos fenólicos gerou níveis de redução promissores em comparação com fungicidas sintéticos.

Em alguns casos, a falta de correlação entre o ergosterol e a enumeração fúngica é decorrente de mudanças fisiológicas e autólise micelial parcial, que podem afetar dramaticamente o conteúdo de ergosterol da massa micelial residual (STANISZ et al., 2015).

4 CONCLUSÃO

Os extratos das microalgas apresentaram composição promissora e diversificada de ácidos fenólicos e carotenoides, sendo identificados nove diferentes ácidos fenólicos, principalmente ácidos clorogênico, gálico, protocatecóico e hidroxibenzóico, e dois carotenoides principais (astaxantina e β -caroteno), sendo que o extrato de *Nannochloropsis* sp. apresentou a composição mais diversificada. Ambos extratos fenólicos naturais, solúveis em metanol, mostraram efeito inibitório a $40 \mu\text{g mL}^{-1}$, mostrando que pequenas quantidades de extrato são capazes de inibir eficientemente o crescimento de isolados do complexo *F. graminearum*. Ergosterol é um bom indicador de inibição, com alta associação com o crescimento micelial e valores inibitórios de 63 a 93% quando são utilizados extratos naturais. Os experimentos com as misturas sintéticas mostraram que os extratos fenólicos naturais são mais eficientes para inibir a biomassa de *Fusarium*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASKARAN, R.; PULLENCHERI, D.; SOMASUNDARAM, R. Characterization of free, esterified and bound phenolics in custard apple (*Annona squamosa* L) fruit pulp by UPLC-ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 82, p. 121-127, 2016.
- BORGES, L.; MORÓN-VILLARREYES, J. A.; D'OCA, M. G. M.; ABREU, P. C. Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 4449-4454, 2011.
- CIPOLATTI, E. P.; BULSING, B. A.; SÁ, C. S.; BURKERT, C. A. V.; BADIALE-FURLONG, E.; BURKERT, J. F. M. Carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: Antioxidant activity and stability of extracts. **Africal Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 23, p. 1982-1988, 2015.

- CUSTÓDIO, L.; JUSTO, T.; SILVESTRE, L.; BARRADAS, A.; DUARTE, C. V.; PEREIRA, H.; BARREIRA, L.; RAUTER, A. P.; ALBERÍCIO, F.; VARELA, J. Microalgae of different phyla display antioxidant, metal chelating and acetylcholinesterase inhibitory activities. **Food Control**, v. 131, p. 134-140, 2012.
- DEL PONTE, E.; SPOLTI, P.; WARD, T.; GOMES, L. B.; NICOLLI, C. P.; KUHNEM, P. R.; DA SILVA, C. N.; TESSMANN, D. J. Regional and field-specific factors affect the composition of *Fusarium* head blight pathogens in subtropical no-till wheat agroecosystem of Brazil. **Phytopathology**, v. 105, p. 246-254, 2015.
- DESJARDINS, A. E. ***Fusarium* mycotoxins, chemistry, genetics, and biology**, American Phytopathological Society APS Press, St. Paul Minnesota, USA, 2006.
- FORRER, H. R.; MUSA, T.; SCHWAB, F.; JENNY, E.; BUCHELI, T. D.; WETTSTEIN, F. E.; VOGELGSANG, S. *Fusarium* head blight control and prevention of mycotoxin in wheat with botanicals and tannic acid. **Toxins**, v. 6, p. 830-849, 2014.
- FREITAS, R. F.; SCHRACK, E. C.; HE, Q.; SILLIMAN, B. R.; FURLONG, E. B.; TELLES, A. C.; COSTA, C. S. B. Consumer control of the establishment of marsh foundation plants in intertidal mudflats. **Marine Ecology Progress Series**, v. 547, p. 79-89, 2016.
- GOH, L. P.; LOH, S. P.; FATIMAH, M. Y.; PERUMAL, K. Bioaccessibility of carotenoids and tocopherols in marine microalgae, *Nannochloropsis* sp. and *Chaetoceros* sp. **Malaysian Journal of Nutrition**, v. 15, n. 1, p. 77-86, 2009.
- GOMES, L. B.; WARD, T. J.; FURLONG, E. B.; DEL PONTE, E. M. Species composition, toxigenic potential and pathogenicity of *Fusarium graminearum* species complex isolates from southern Brazilian rice. **Plant Pathology Journal** (Print), v. 64, p. 980-987, 2015.
- GRANADO-LORENCIO, F.; OLMEDILLA-ALONSO, B.; HERRERO-BARBUDO, C.; BLANCO-NAVARRO, I.; PÉREZ-SACRISTÁN, B.; BLÁZQUEZ-GARCÍA, S. *In vitro* bioaccessibility of carotenoids and tocopherols from fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 102, p. 641-648, 2007.
- GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. L.; CHANLEY, M. H. (eds) **Culture of Marine Invertebrate Animals**, Plenum, New York, p. 29-60, 1975.
- GUTAROWSKA, B.; ZAKOWSKA, Z. Mathematical models of mycelium growth and ergosterol synthesis in stationary mould culture. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p. 605-610, 2009.
- HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; TRALAMAZZA, S. M.; FERREIRA, C. F. J.; CORRÊA, B.; BADIALE-FURLONG, E. Effect of natural compounds on *Fusarium graminearum* complex. **Journal of the Science and Food Agriculture**, v. 96, n. 12, p. 3998-4008, 2016.
- LIYANA-PATHIRANA, C.; SHAHIDI, F. Important of insoluble-bound phenolics to antioxidant properties of wheat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 1256-1264, 2006.

MADONNA, A. J.; VOORHEES, K. J.; HADFIELD, T. L. Rapid detection of taxonomically important fatty acid methyl ester and steroid biomarkers using in situ thermal hydrolysis/methylation mass spectrometry (THM-MS): implications for bioaerosol detection. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 61, p. 65-89, 2001.

MARINOVA, E. M.; TONEVA, A.; YANISHLIEVA, N. Comparison of the antioxidative properties of caffeic and chlorogenic acids. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1498-1502, 2009.

MILLAO, S.; UQUICHE, E. Antioxidant activity of supercritical extracts from *Nannochloropsis gaditana*: Correlation with its content of carotenoids and tocopherols. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 111, p. 143-150., 2016.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. **Energy Conversion and Management**, v. 48, p. 2169-2173, 2007.

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

NOBRE, B. P.; VILLALOBOS, F.; BARRAGÁN, B. E.; OLIVEIRA, A. C.; BATISTA, A. P.; MARQUES, P. A. S. S.; MENDES, R. L.; SOVOVÁ, H.; PALAVRA, A. F.; GOUVEIA, L. A biorefinery from *Nannochloropsis* sp. microalga – Extraction of oils and pigments. Production of biohydrogen from the leftover biomass. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 128-136, 2013.

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

PAGNUSSATT, F. A.; DE LIMA, V. R.; DORA, C. L.; COSTA, J. A. V.; PUTAUX, J. L.; BADIALE-FURLONG, E. Assessment of the encapsulation effect of phenolic compounds from *Spirulina* sp. LEB-18 on their antifusarium activities. **Food Chemistry**, v. 211, p. 616-623, 2016.

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

PALIWAL, C.; GHOSH, T.; GEORGE, B.; PANCH, I.; MAURYA, R.; CHOKSHI, K.; GHOSH, A.; MISHRA, S. Microalgal carotenoids: Potential nutraceutical compounds with chemotaxonomic importance. **Algal Research**, v. 15, p. 24-31, 2016.

PAUL, P. A.; LIPPS, P. E.; HERSHMAN, D. E.; MCMULLEN, M. P.; DRAPER, M. A.; MADDEN, L. V. Efficacy of triazole-based fungicides for *Fusarium* head blight and deoxynivalenol control in wheat: A multivariate meta-analysis. **Phytopathology**, v. 98, p. 999-1011, 2008.

- PLAZA, M.; HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Innovative natural functional ingredients from microalgae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 7159-7170, 2009.
- POREP, J. U.; WALTER, R.; KORTEKAMP, A.; CARLE, R. Ergosterol as an objective indicator for grape rot and fungal biomass in grapes. **Food Control**, v. 37, p. 77-84, 2014.
- PRONYK, C.; ABRAMSON, D.; MUIR, W. E.; WHITE, N. D. G. Correlation of total ergosterol levels in stored canola with fungal deterioration. **Journal of Stored Products Research**, v. 42, p. 162-172, 2006.
- QUIDEAU, S.; DEFFIEUX, D.; DOUAT-CASASSUS, C.; POUYÉGU, L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, p. 586-621, 2011.
- RAKSHIT, S.; MANDAL, L.; PAL, B. C.; BAGCHI, J.; BISWAS, N.; CHAUDHURI, J.; CHOWDHURY, A. A.; MANNA, A.; CHAUDHURI, U.; KONAR, A.; MUKHERJEE, T.; JAISANKAR, P.; BANDYOPADHYAY, S. Involvement of ROS in chlorogenic acid-induced apoptosis of Bcr-Abl⁺ CML cells. **Biochemistry Pharmacology**, v. 80, p. 1662-1675, 2010.
- RAO, V. T.; REDDY, P. S.; REDDEY, B. V. S.; KUMAR, A. A. Ergosterol as an indicator of mold resistance in white and colored grain sorghum hybrids. **Crop Protection**, v. 37, p. 7-12, 2012.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in food**. Human Nutrition Institute – International Life Sciences Institute, Washington, USA, 2001.
- SCAGLIONI, P. T.; DE SOUZA, T. D.; SCHMIDT, C. G.; BADIALE-FURLONG, E. Availability of free and bound phenolic compounds in rice after hydrothermal treatment. **Journal of Cereal Science**, v. 60, p. 526-532, 2014.
- SCHÖNEBERG, A.; MUSA, T.; VOEGELE, R. T.; VOGELGSANG, S. The potential of antagonistic fungi for control of *Fusarium graminearum* and *Fusarium crookwellense* varies depending on the experimental approach. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, p. 1165-1179, 2015.
- SHAO, Y.; PAN, J.; ZHANG, C.; JIANG, L.; HE, Y. Detection in situ of carotenoid in microalgae by transmission spectroscopy. **Computers and Electronic in Agriculture**, v. 112, p. 121-127, 2015.
- 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.
- SINGH, A.; BAJPAI, V.; KUMAR, S.; KUMAR, B.; SRIVASTAVA, M.; RAMESHKUMAR, K. B. Comparative profiling of phenolic compounds from different plant parts of six *Terminalia* species by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with chemometric analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 87, p. 236-246, 2016.

SKROZA, D.; MEKINIC, I. G.; SVILOVIC, S.; SIMAT, V.; KATALINIC, V. Investigation of the potential synergistic effect of resveratrol with other phenolic compounds: A case of binary phenolic mixtures. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 38, p. 13-18, 2015.

SOUZA, M. M.; PRIETO, 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, p. 1050-1058, 2011.

STANISZ, E.; ZGOLA-GRZESKOWIAK, A.; WASKIEWICZ, A.; STEPIEN, L.; BESZTERDA, M. Can ergosterol be an indicator of *Fusarium* fungi and mycotoxins in cereal products? **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, p. 705-712, 2015.

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.

WEGULO, S. N.; BAENZIGER, P. S.; HERNANDEZ-NOPSA, J.; BOCKUS, W. W.; HALLEN-ADAMS, H. Management of *Fusarium* head blight of wheat and barley. **Crop Protection**, v. 73, p. 100-107, 2015.

**ARTIGO III - APLICAÇÃO DE ANTIFÚNGICOS NATURAIS E SEU IMPACTO NA
QUALIDADE DOS GRÃOS, OCORRÊNCIA DE DOENÇAS FÚNGICAS E
PRODUÇÃO DE TRICOTECENOS EM CAMPOS DE TRIGO NO NOROESTE DA
ITÁLIA**

RESUMO

Este estudo avaliou o efeito de extratos fenólicos de *Nannochloropsis* sp. e *Spirulina* sp. aplicados em campos de trigo no Noroeste da Itália quanto à qualidade dos grãos e ocorrência de doenças fúngicas e tricotecenos. Primeiramente, foi conduzido um experimento *in vitro* utilizando grãos de trigo como meio de cultura para o desenvolvimento do isolado fúngico (CML 3607, pertencente ao complexo *F. graminearum*), os tratamentos com extratos fenólicos de *Nannochloropsis* sp., *Spirulina* sp. e tebuconazol inibiram a biomassa fúngica na ordem de 67, 62 e 85%, respectivamente em relação aos controles. A redução da atividade da enzima α -amilase alcançou valores de 82% (*Nannochloropsis* sp.), 69% (*Spirulina* sp.) e 78% (tebuconazol). A inibição da produção de ergosterol apresentou valores de 81% (*Nannochloropsis* sp.), 90% (*Spirulina* sp.) e 99% (tebuconazol). Com a dose aplicada no experimento *in vitro* (64 mL m^{-2}), os extratos fenólicos de *Nannochloropsis* sp. ($45 \mu\text{g mL}^{-1}$) e *Spirulina* sp. ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$) inibiram em média, respectivamente, 82 e 68% a produção de tricotecenos, enquanto que a aplicação do tebuconazol favoreceu a produção de micotoxinas. Nos experimentos de campo os extratos fenólicos de microalgas foram tão eficientes quanto o tebuconazol para inibir a fusariose. Nestes experimentos foram utilizadas doses de 12 mL m^{-2} dos extratos de microalgas na mesma concentração que no experimento *in vitro*, o extrato de *Nannochloropsis* sp. inibiu até 38% da produção de deoxinivalenol, enquanto que o extrato de *Spirulina* sp. chegou a níveis de inibição de 55% para esta micotoxina. Desta forma, os extratos de microalgas possuem a capacidade antimicotoxigênica e os níveis necessários para mitigar o problema são viáveis em cultivo em grande escala.

Palavras-chave: Giberela. *Fusarium*. Tricotecenos. Trigo. *Nannochloropsis* sp. *Spirulina* sp.

1 INTRODUÇÃO

A contaminação de alimentos por fungos representa um perigo à saúde pública, pois esses micro-organismos, além de diminuir a disponibilidade de nutrientes, alteram as características sensoriais e podem produzir substâncias tóxicas (KUMAR et al., 2010). O maior desafio para vencer o impacto destes contaminantes está na ubiquidade das espécies fúngicas, iniciando o risco desde as culturas de grão até o armazenamento e preparo.

As espécies de *Fusarium* são patogênicas para as plantas antes ou imediatamente após a colheita (MUGRABI-DE-KUPPLER et al., 2011). A contaminação fúngica por este gênero ocasiona danos nas culturas, tais como diminuição da produtividade e alteração na qualidade dos grãos. Dentre estes se encontram também espécies produtoras de micotoxinas em resposta a condições ambientais desfavoráveis ao desenvolvimento fúngico.

A principal classe de micotoxinas produzidas por *F. graminearum* é representada por tricotecenos, que atuam como potentes inibidores da síntese protéica em eucariotos e são responsáveis por toxicoses em humanos e animais (SNIJDERS, 1990). A produção destes compostos é uma das consequências negativas associada à contaminação de trigo por *Fusarium*, destacando a micotoxina deoxinivalenol (DON), também conhecida como vomitoxina. A ingestão de alimento contaminado com esta micotoxina é responsável por sintomas, tais como recusa alimentar, diarreia, vômito, hemorragia e dermatite de contato em animais. Em humanos, o decréscimo na taxa de leucócitos, náusea, vômito, anorexia e convulsões estão relacionados a contaminações de alimentos por *F. graminearum* que encontraram condições para a produção de DON (BRYDEN, 2007; EHLING et al., 1998). Por isso, durante o cultivo são utilizadas estratégias para manejo da incidência fúngica e mitigação da contaminação micotoxicológica.

A fusariose (giberela) na planta é uma doença altamente destrutiva que pode ocorrer em todas as áreas produtoras de trigo do mundo. As consequências dela são a senescência total ou parcial da espiga precocemente, que consequentemente, reduz os rendimentos das culturas e qualidade do grão. Existem diversas variedades de fungos que podem estar envolvidos na promoção desta doença, entre elas, a *Gibberella zeae* (Anamorfo *Fusarium graminearum*) que é uma das principais causas de produção e acúmulo de tricotecenos do tipo B em grãos de trigo (SCARPINO et al., 2015).

A septoriose ou mancha das glumas e dos nós do trigo, causada pelo fungo ascomiceto *Mycosphaerella graminicola* (forma assexuada – *Septoria tritici*), também é uma

das doenças do trigo. Esta é caracterizada por lesões necróticas nas folhas e no caule que se desenvolve depois que as células infectadas colapsam. A doença é prevalente em condições de clima frio e úmido (SHAH; BERGSTROM; SORELLS, 2000). A contaminação ocorre quando as condições ambientais como umidade, temperatura e intensidade da luz são favoráveis ao fungo no período entre a antese e a formação do grão (NELSON; MARSHALL, 1990), resultando em perda de produtividade e qualidade dos grãos (XU; FRIESEN; CAI, 2004).

Fungicidas sintéticos são usados para controle da patogenicidade e toxicidade de micro-organismos (HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2012), entretanto, problemas toxicológicos em humanos e animais de criação, bem como a deterioração da qualidade ambiental estão associados ao uso indiscriminado dessas substâncias. Situação que motiva a busca pela preservação de grãos empregando compostos naturais (DORS et al., 2011; HUSSEIN et al., 2011; PAGNUSSATT et al., 2011).

Em vista da toxicidade e da pouca eficiência de alguns princípios ativos para evitar a doença e a produção de micotoxinas, tem sido recomendadas diferentes estratégias para garantir a qualidade do produto final e diminuir o risco de deterioração ou de produção destas toxinas (ZAO et al., 2010). Dentre elas está o manejo do solo e os períodos de aplicação dos pesticidas (BLANDINO et al., 2012).

Alguns estudos têm documentado o efeito antifúngico e antimicotoxigênico de compostos fenólicos obtidos de microalgas (DANYAL; MUBEEN; MALIK, 2013; PAGNUSSATT et al., 2014, 2016; SOUZA et al., 2011). No entanto, o mecanismo de ação na inibição do desenvolvimento do micro-organismo e da produção de micotoxinas, bem como as quantidades necessárias, precisam ser esclarecidos antes de viabilizar seu uso em grande escala (SAMAPUNDO et al., 2007).

Os experimentos realizados *in vitro* para estimar a atividade antifúngica de compostos naturais são muitos (DANYAL; MUBEEN; MALIK, 2013; EL-HOSSARY et al., 2017; PAGNUSSATT et al., 2014, 2016; SOUZA et al., 2011; WIANOWSKA et al., 2016), porém faltam informações e protocolos para aplicá-los em escala de cultivo de maneira viável. Considerando resultados de outros autores e dados experimentais obtidos no Artigo II sobre a inibição específica e o EC_{50} obtidos usando extratos fenólicos de microalgas, este trabalho foi realizado. Nele, o objetivo foi avaliar o efeito da aplicação de extratos fenólicos de microalgas em grãos e nas culturas de trigo quanto aos parâmetros de qualidade dos grãos, severidade de incidência fúngica e contaminação por tricotecenos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS FENÓLICOS DE MICROALGAS

Os extratos contendo os ácidos fenólicos solúveis em metanol de ambas as microalgas foram obtidos conforme procedimento descrito no Artigo I (PAGNUSSATT et al., 2014; SCAGLIONI et al., 2014). O teor fenólico também foi determinado nas amostras de trigo submetidas a diferentes tratamentos no campo.

2.2 CAPACIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS DE MICROALGAS CONTRA CEPA DE *Fusarium graminearum* (CML 3607)

O experimento *in vitro* foi conduzido em placas de petri contendo 10 mL de ABD ou 3 mL de solução nutriente (composta por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 e MgSO_4) e 12 g de grãos de trigo inteiros previamente esterilizados em autoclave.

Cada tratamento consistiu em adicionar o volume de extrato fenólico de microalgas com concentração correspondente ao valor de EC_{50} (estimado no Artigo II, em torno de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$), e posterior inoculação de um disco de micélio da cepa CML 3607 (1,1 mm de diâmetro) no centro de cada placa. Este isolado foi proveniente de cultura de trigo e está depositado na coleção micológica de Lavras (CML - Coleção Micológica de Lavras). O controle foi cultivado com volume de água estéril equivalente ao dos extratos fenólicos. Também foi realizado um tratamento com o fungicida tebuconazol na dose usual recomendada ($0,6 \text{ mg mL}^{-1}$).

As placas de Petri com o inóculo foram incubadas a 25°C , fotoperíodo claro / escuro de 12-12 h. A eficácia dos tratamentos foi avaliada diariamente durante sete dias, medindo o diâmetro do desenvolvimento da hifa ortogonalmente. Todos os testes foram realizados em triplicata.

A alteração na morfologia do fungo ao final do período de incubação foi analisada macro e microscopicamente. Foi utilizado um microscópio confocal Leica SP8, PMT1 Gain 803,6, Offset -3,99, com o laser de excitação em 488 nm, potencial 53,6%, e emissão 500-630 nm e sequenciamento de imagem de 17 camadas com $40 \mu\text{m}$ de espessura total.

2.3 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE ERGOSTEROL

O conteúdo de ergosterol foi determinado conforme procedimento descrito no Artigo II (FREITAS et al., 2016; GUTAROWSKA; ZAKOWSKA, 2009).

2.4 ATIVIDADE DA α -AMILASE

Todo o conteúdo de cada placa de petri foi pesado e moído. A extração da enzima foi realizada com adição de 10 mL de NaCl 0,5% em agitador orbital a 30 °C por 60 min. A suspensão foi centrifugada a 3220 *g* a 4 °C por 10 min e logo após filtrada com papel Whatman nº1 usando banho de gelo. O filtrado (extrato enzimático) foi utilizado na etapa de dextrinização, onde: em tubo de ensaio foram adicionados 0,5 mL de amido 0,1%, 0,1 mL de tampão ácido cítrico-fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 6,0 e 3,0 mL de água destilada, a mistura foi levada a banho-maria a 50 °C por 5 min, após foi adicionado 0,1 mL do extrato enzimático, sendo incubado por mais 5 min. Foi utilizado 0,5 mL de HCl 1 mol L⁻¹ para interromper a reação. No tubo controle foi utilizada água no lugar do extrato enzimático. A todos os tubos foram adicionados 0,1 mL de solução de iodo (0,3% de I₂ em solução KI 3%) e 8,4 mL de água destilada. Após 15 min a absorvância foi lida em espectrofotômetro a 620 nm (BARAJ; GARDA-BUFFON; BADIALE-FURLONG, 2010).

A estimativa da atividade enzimática foi realizada utilizando curva padrão de amido cujo modelo linear era $y=7,72x$ (linearidade de 0,02 a 0,2 mg mL⁻¹). E a atividade específica foi calculada pela relação do porcentual de redução da atividade (em relação ao tratamento controle) com a quantidade de princípio ativo adicionado no meio de cultivo (concentração fenólica, no caso dos extratos naturais, e concentração de tebuconazol, no caso do fungicida comercial).

2.5 APLICAÇÃO DOS EXTRATOS DE MICROALGAS EM CULTURAS DE TRIGO

O experimento *in vivo* ocorreu no período de maio a junho de 2015 através da aplicação dos extratos naturais e dos fungicidas sintéticos em dois campos experimentais de trigo, situados na região noroeste da Itália, no mesmo período de 2016 o desenho experimental contido na Tabela 2 foi realizado novamente a fim de comparar a eficiência em dois anos de cultivo distintos.

A aplicação dos extratos e fungicidas foi realizada na fase de crescimento 62 (início da floração) com pulverizador com bico de precisão 3 (T-Jeet 110/04) e pressão de saída no bocal de 324 kPa. Em todos os campos, cada lote media 12 m².

A Tabela 1 mostra os tratamentos realizados em Carmagnola (44°50' N, 7° 40' E, altitude 245 m), onde foi cultivado trigo duro, cultivar Saragolla (susceptível a Giberela), com aração, sendo a cultura precedente nesse campo o trigo comum. Foi utilizado um desenho experimental de parcelas subdivididas, com inoculação artificial como fator principal, com três repetições.

O trigo comum foi cultivado em Buriasco (44°52' N, 7°26' E), cultivar Altamira, com cultura precedente de milho. A Tabela 2 mostra os diferentes tratamentos utilizados para esse cultivo. Neste caso foi utilizado um desenho experimental de parcelas subdivididas, com o preparo do solo como fator principal, com quatro repetições. Sendo usadas condições de aração e cultivo mínimo.

Tabela 1 - Tratamentos realizados no cultivo de trigo duro.

Código	Tratamento	Extrato Microalgas	Fungicida
1	Controle	-	-
2	<i>Spirulina</i> sp.	<i>Spirulina</i> sp. (40,0 µg mL ⁻¹)	-
3	<i>Nannochloropsis</i> sp.	<i>Nannochloropsis</i> sp. (45,2 µg mL ⁻¹)	-
4	Protioconazol	-	Protioconazol (200 g.i.a. ha ⁻¹)*
5	Tebuconazol	-	Tebuconazol (200 g.i.a. ha ⁻¹)*
6	<i>Spirulina</i> sp. + Tebuconazol	<i>Spirulina</i> sp. (40,0 µg mL ⁻¹)	Tebuconazol (200 g.i.a. ha ⁻¹)*
7	<i>Nannochloropsis</i> sp. + Tebuconazol	<i>Nannochloropsis</i> sp. (45,2 µg mL ⁻¹)	Tebuconazol (200 g.i.a. ha ⁻¹)*
8	Tebuconazol (meia dose)	-	Tebuconazol (100 g.i.a. ha ⁻¹)*
9	<i>Spirulina</i> sp. + Tebuconazol (meia dose)	<i>Spirulina</i> sp. (40,0 µg mL ⁻¹)	Tebuconazol (100 g.i.a. ha ⁻¹)*
10	<i>Nannochloropsis</i> sp. + Tebuconazol (meia dose)	<i>Nannochloropsis</i> sp. (45,2 µg mL ⁻¹)	Tebuconazol (100 g.i.a. ha ⁻¹)*

*g.i.a.: grama de ingrediente ativo por hectare (valores correspondentes a dose usual recomendada)

2.6 SINTOMAS DE FUSARIOSE (GIBERELA)

A incidência e severidade da fusariose foram registradas para cada experimento através da realização de avaliações visuais da doença na fase de massa mole do grão (*Growth Stage* - GS 85). A incidência foi calculada como a percentagem de espigas com sintomas da doença, utilizando-se 200 espigas por experimento. A severidade foi calculada como a percentagem de grãos por espiga com sintomas, sendo estimada com uma escala de 0 a 7, em que cada valor numérico corresponde a um intervalo de percentagem de superfícies que

exibem sintomas visíveis da doença (PARRY; JENKINSON; MCLEOD, 1995), seguindo o seguinte esquema: 1 = 0 – 5%, 2 = 5 – 15%, 3 = 15 – 30%; 4 = 30 – 50%, 5 = 50 – 75%, 6 = 75 – 90% , 7 = 90 – 100%.

Tabela 2 - Tratamentos realizados no cultivo de trigo comum.

N	Tratamento	Preparo do solo	Extrato Microalgas	Fungicida
1	Controle	Aração	-	-
2	<i>Spirulina</i> sp.	Aração	<i>Spirulina</i> sp. (40,0 µg mL ⁻¹)	-
3	<i>Nannochloropsis</i> sp.	Aração	<i>Nannochloropsis</i> sp. (45,2 µg mL ⁻¹)	-
4	Tebuconazol	Aração	-	Tebuconazol (200 g.i.a. ha ⁻¹)*
5	Protiocanazol	Aração	-	Protiocanazol (200 g.i.a. ha ⁻¹)*
6	Tebuconazol + Protiocanazol	Aração	-	Teb (100 g.i.a. ha ⁻¹) + Prot (100 g.i.a. ha ⁻¹)*
7	Controle	Cultivo mínimo	-	-
8	<i>Spirulina</i> sp.	Cultivo mínimo	<i>Spirulina</i> sp. (40,0 µg mL ⁻¹)	-
9	<i>Nannochloropsis</i> sp.	Cultivo mínimo	<i>Nannochloropsis</i> sp. (45,2 µg mL ⁻¹)	-
10	Tebuconazol	Cultivo mínimo	-	Tebuconazol (200 g.i.a. ha ⁻¹)*
11	Protiocanazol	Cultivo mínimo	-	Protiocanazol (200 g.i.a. ha ⁻¹)*
12	Tebuconazol + Protiocanazol	Cultivo mínimo	-	Teb (100 g.i.a. ha ⁻¹) + Prot (100 g.i.a. ha ⁻¹)*

*g.i.a.: grama de ingrediente ativo por hectare (valores correspondentes a dose usual recomendada). Teb.: Tebuconazol; Prot.: Protiocanazol

2.7 AVALIAÇÃO DA SEPTORIOSE

Para cada experimento, a incidência de septoriose foi registrada após avaliação visual na fase de massa mole do grão (GS85). A doença foliar foi classificada em 6 classes (0 = 0%; 1 = 2%; 2 = 5%; 3 = 10%; 4 = 25%; 5 = 50%; 6 = 50%) de acordo com os sintomas visíveis. Foram utilizadas 15 folhas bandeira e 15 penúltima folhas, escolhidas aleatoriamente.

2.8 AVALIAÇÃO DO VERDOR DA FOLHA BANDEIRA

Foi utilizado um sensor óptico de mão, GreenSeeker TM® (Trimble®, Sunnyvale, Califórnia, EUA), para medir a biomassa fotossinteticamente ativa do topo da planta ao final, na fase de enchimento dos grãos, após a aplicação dos extratos. O instrumento foi mantido aproximadamente 80 cm acima do cultivo e sua resolução espacial efetiva foi 2 m².

Este método é não destrutivo e pode ser realizado em tempo real. O dispositivo utiliza a radiação ativa para obter dados de refletância, que é independente da iluminação solar. Ele tem sua própria fonte consistente de emissão de luz, detectores de fotodiodo e filtros

de interferência para o vermelho [R] e infravermelho próximo [NIR] (JORDAN, 1969). Desta forma foram gerados os Índices de Vegetação por Diferença Normalizada (IVDN), de acordo com a Equação 1 (ROUSE et al., 1974) que são proporcionais à biomassa da cultura e o verdor. Onde RNIR é a refletância de radiação NIR e RRed é a refletância da radiação vermelha visível.

$$IVDN = \frac{RNIR - RRed}{RNIR + RRed} \quad (1)$$

2.9 PARÂMETROS PRODUTIVOS E DE COMPOSIÇÃO DO GRÃO DE TRIGO

Após realização da colheita, foram determinados alguns parâmetros que permitiram verificar se os tratamentos acarretaram em aumento na produção de grão. Sendo eles: umidade e peso hectolitro, através do analisador de grãos Dickey-John GAC2100 (Corp. Auburn, IL, USA) e o peso de mil grãos, onde foram coletados aleatoriamente duzentos grãos a partir de cada amostra que pesava 1 kg.

O teor de proteínas, cinzas e glúten contido nas amostras foi determinado pela tecnologia de transmissão de infravermelho próximo, usando um Infratec TM 1241 Grain Analyser instrument (Foss, Silver Spring, MD, USA), sendo apresentados os valores com base em matéria seca.

2.10 DETERMINAÇÃO DE TRICOTECENOS

As amostras (secas e armazenadas congeladas) foram moídas até 32 mesh, 10 g destas foram homogeneizadas com 20 mL de água destilada. Foi realizada uma etapa de desengorduramento com hexano (duas vezes de 10 mL). A extração foi realizada com 20 mL de acetonitrila em agitador orbital a 170 rpm por 20 min. A etapa de adição de sais consistiu em utilizar 6 g de sulfato de magnésio anidro e 2 g de cloreto de sódio, o conteúdo foi agitado em vórtex por 2 min, centrifugado a 3220 g por 10 min. Ao sobrenadante foram adicionados 0,3 g de sulfato de magnésio anidro e 0,1 g de C18, a mistura permaneceu 30 s em vórtex e foi novamente centrifugada a 3220 g por 5 min. Foram recolhidos 3 mL do sobrenadante para frasco âmbar e seu conteúdo foi seco em banho-maria a 60 °C (ANASTASSIADES et al., 2003, modificado por SEUS, 2014).

Para identificação e quantificação dos tricotecenos NIV, DON e acetilados (ADONS) (15-acetildeoxinivalenol (15-ADON) e 3-acetildeoxinivalenol (3-ADON)) foi utilizada cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu, Tóquio, Japão, CLASSE-M10A) acoplada à detecção de radiação ultravioleta, com o uso de uma coluna de fase reversa C18 Gemini 5,0 μm (250 x 4,6 mm), operando no modo de eluição isocrático. Com um fluxo de injeção de 0,5 mL min⁻¹, tempo de corrida total de 15 min, fase móvel composta por acetonitrila:água (70:30) e detecção a 220 nm (SEUS, 2014). Seguindo as seguintes curvas-padrão: NIV: $y=16479x + 716,51$, linearidade de 165 a 2353 $\mu\text{g kg}^{-1}$; DON: $y=70828x - 3186$, linearidade de 59 a 2353 $\mu\text{g kg}^{-1}$; ADONS: $y=51832x + 8297,3$, linearidade de 471 a 4706 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Somente para as amostras de trigo resultantes da aplicação dos extratos no campo, primeiramente, a concentração de DON foi determinada de acordo com o método de ELISA Ridascreen® DON (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany). Para isso foram utilizadas sub-amostras de 20 g (moídas a diâmetro de 1 mm). Estas foram diluídas em 100 mL de água destilada e submetidas a agitação durante 15 min a 270 rpm em agitador orbital. O sobrenadante foi filtrado através de papel Whatman® nº1 e foi realizada uma diluição de 1:10, para abranger a faixa de quantificação de 185 a 5000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, utilizando um leitor de placas a 450 nm (Digital & Analog Systems srl, Ralombara Sabina, RM; Italy).

Para confirmação dos resultados obtidos por ELISA, foi utilizado método de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado com detector de massas (HPLC-MS-MS), com uma faixa de linearidade de 20 – 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Foram utilizados 25 g de amostra moída, extraídas com 100 mL de água por 30 min. Todo o extrato foi recolhido. Foram utilizadas colunas baseadas em anticorpos de imunoafinidade (DON test™ WB Columns VICAM) para o *clean-up* dos extratos. Primeiramente cada coluna foi condicionada com 1 mL de água deionizada, logo em seguida carregada com 1 mL do extrato de cada amostra, a uma taxa de 1-2 gotas s⁻¹. As colunas foram lavadas com 2,5 mL de água deionizada e por fim o DON foi eluído da coluna com 2 mL de metanol.

A quantificação foi realizada pela injeção de 10 μL de eluato diluído no sistema HPLC-MS-MS, que consistiu em uma bomba cromatográfica Varian 212-LC e um espectrômetro de massa 310-LC-MS TQ. Foi utilizada uma coluna analítica de fase reversa Varian Polaris C18-A (100 x 2,00 mm, 3 μm) e a fase móvel foi uma mistura de metanol e água com fluxo de 0,2 mL min⁻¹ (SOVRANI et al., 2012).

2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de variância (ANOVA) foi aplicada aos resultados, seguida do teste de Tukey com nível de confiança de 90%, pelo software Statistica 10.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EFEITO DOS EXTRATOS DE MICROALGAS NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA FÚNGICA *in vitro*

Neste experimento os extratos de microalgas e o fungicida sintético foram adicionados ao meio de cultivo convencional e aos grãos de trigo como substrato para melhor compreensão do mecanismo de inibição e inferência sobre as concentrações mínimas, com o objetivo de avaliar o efeito nos fungos.

3.1.1 Formação de halo micelial

O halo de desenvolvimento fúngico foi medido a cada 24 h e o comportamento está mostrado na Figura 1. Ambos os extratos de microalgas mostraram percentual de inibição em torno de 70% para todos os tratamentos até 96 h após a inoculação. Ao final do período de incubação, o extrato fenólico de *Nannochloropsis* sp. inibiu o desenvolvimento fúngico em 67, 34, e 18% no meio com ágar; ágar e grãos de trigo; e solução nutriente e grãos de trigo, respectivamente. Enquanto que o extrato de *Spirulina* sp. inibiu 62, 25 e 21%, nos mesmos arranjos experimentais.

O tebuconazol inibiu 85, 75 e 55%, conforme esperado, pois se trata de um composto comercial formulado para atuar em amplo espectro de espécies fúngicas. No entanto, ficou demonstrado que os extratos de microalgas também possuem capacidade de inibir a formação de halo característico do desenvolvimento fúngico. O aumento da complexidade do substrato (grãos de trigo) representa melhor as condições reais encontradas pelo fungo no campo e isto permitiu inferir que os extratos fenólicos são antifúngicos promissores principalmente nos primeiros dias da aplicação.

Na Figura 2 estão ilustradas as variações observadas nas características das hifas formadas nas placas quando o substrato era ágar e grãos de trigo, comparativamente com o

tratamento controle. Nelas é possível observar que a biomassa é menor após 24 h de incubação. Ao final do período, as hifas do tratamento controle apresentaram característica de envelhecimento (alteração na cor), enquanto que as dos meios tratados com os extratos de microalgas mostraram hifas que ainda apresentam aspecto de biomassa em desenvolvimento.

Figura 1 - Desenvolvimento do halo da cepa CML 3607 do complexo *F. graminearum* submetida a diferentes tratamentos.

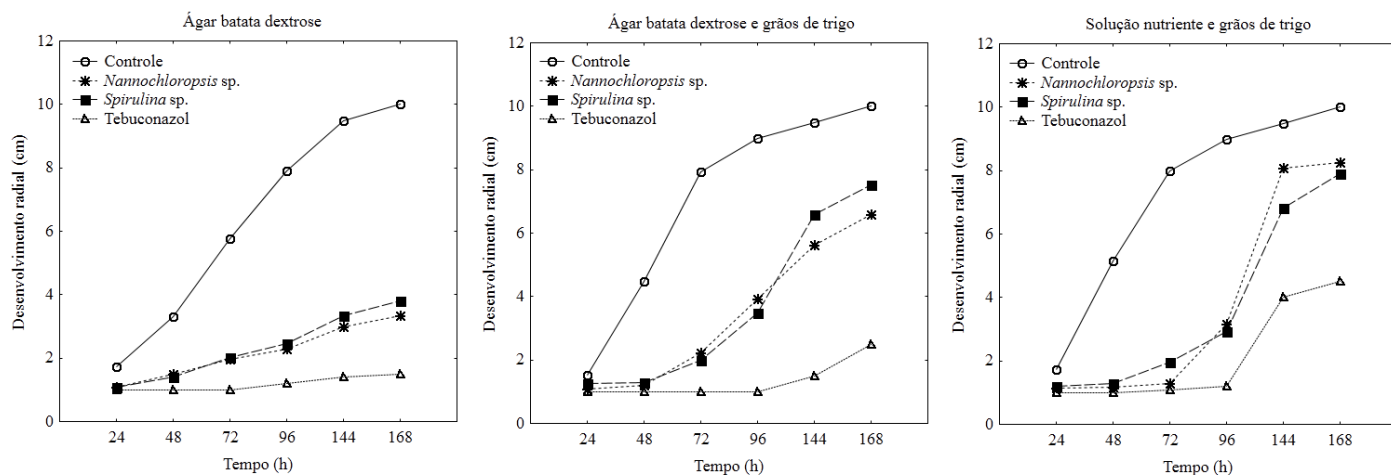
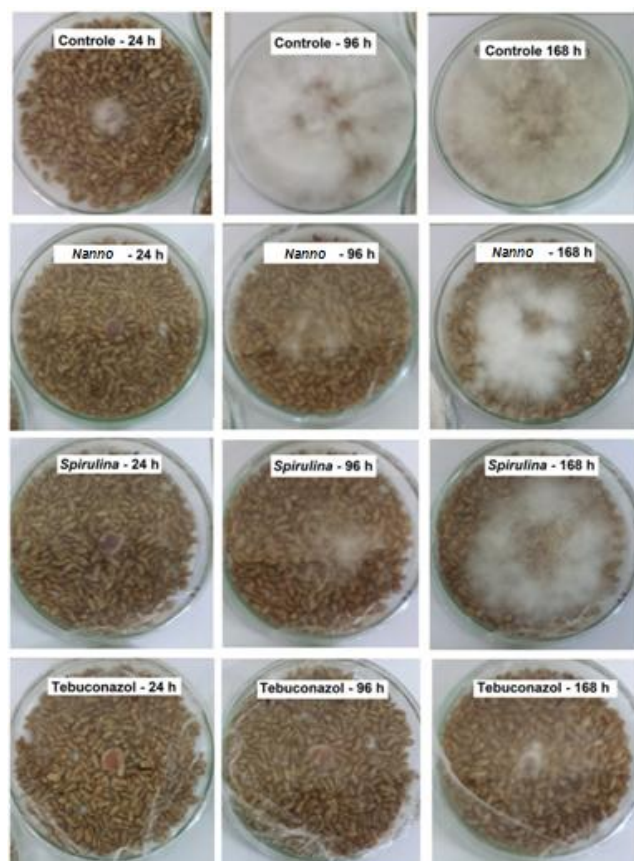
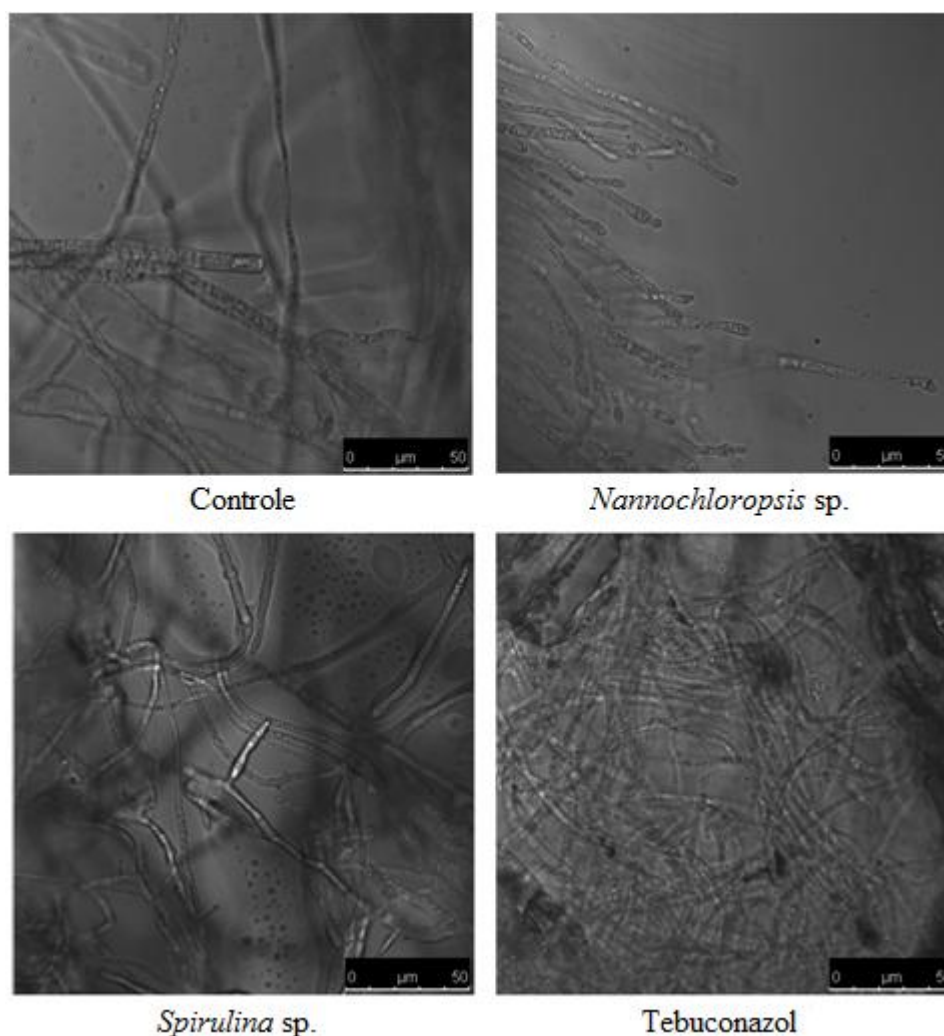


Figura 2 - Produção de biomassa fúngica pela cepa CML 3607 do complexo *F. graminearum* após 24, 96 e 168 h incubadas com ágar batata dextrose e grãos de trigo na presença de água (controle), extrato fenólico de *Nannochloropsis* sp., extrato fenólico de *Spirulina* sp. e tebuconazol.



Comparando as características microscópicas das hifas formadas na biomassa sob diferentes tratamentos (Figura 3), as formadas no tratamento controle estão mais largas e turgidas. Os tratamentos com *Nannochloropsis* sp. e *Spirulina* sp. apresentaram hifas mais finas e pouco túrgidas. Apenas neste, as paredes celulares parecem mais espessas, com os septos mais definidos. Com a biomassa tratada com tebuconazol as hifas são finas e curtas, além de mais compactadas. Fatos que possivelmente reflitam os efeitos dos fungicidas naturais e sintético na troca de matéria com o meio. Além disso, a maior alteração verificada no aspecto visual do fungo causada pelo tebuconazol pode levar o fungo a condições de estresse, resultando na produção de seus metabólitos tóxicos como forma de defesa (HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2016).

Figura 3 - Morfologia da cepa CML 3607 do complexo *F. graminearum* após inoculação por 168 h com ágar batata dextrose na presença de água (controle), extrato fenólicos de *Nannochloropsis* sp., *Spirulina* sp. e tebuconazol.



3.1.2 Produção de ergosterol

Considerando que a presença de trigo no meio de cultivo dificulta a medida da evolução do halo, foi realizada a determinação do ergosterol. Este se mostrou em outros experimentos (Artigo II) estar fortemente correlacionado com o aumento da biomassa de fungos do complexo *Fusarium*.

A redução na concentração do ergosterol (Tabela 3) confirmou que este é um bom indicativo do desenvolvimento fúngico. Nos tratamentos com os princípios ativos aplicados aos meios com grãos de trigo, a redução da produção de ergosterol foi menor. Fato que indica que o umedecimento da semente e a consequente degradação endógena beneficiou o aumento da biomassa fúngica, como acontece na natureza, pois as enzimas endógenas promovem a hidrólise e disponibilização de substrato.

3.1.3 Inibição de α -amilase pelos extratos de microalgas

Os resultados da inibição do halo e da produção de ergosterol nortearam o interesse em buscar a compreensão do mecanismo de ação dos extratos e o princípio ativo sintético para limitar o crescimento da biomassa.

Quando os extratos foram aplicados ao meio de cultivo a capacidade de inibição da enzima ocorreu nas primeiras 24 h, aumentando ao final do período de incubação (Tabela 3) em níveis de 82, 69 e 78% para os extratos de *Nannochloropsis* sp., *Spirulina* sp. e tebuconazol, respectivamente. Porém, quando aplicados aos grãos de trigo (substrato fúngico) apenas o extrato fenólico de *Nannochloropsis* sp. manteve a inibição da enzima acima de 60% por todo o período avaliado. O extrato de *Spirulina* sp. inibiu a enzima somente no período inicial do desenvolvimento da biomassa e o tebuconazol resultou em pequena inibição ao final do período (17%). Neste caso, a manutenção da atividade possivelmente foi decorrente da enzima presente nos grãos de trigo, pois se sabe que esta enzima endógena é responsável pela germinação e maturação de sementes. A germinação da semente é provocada por aumento na temperatura e na umidade. Por conseguinte, o embrião sintetiza o fitohormônio ácido giberélico que induz novamente a síntese de α -amilase e outras hidrolases (MURALIKRISHNA; NIRMALA, 2005). No caso da incubação dos grãos juntamente com a cepa de *F. graminearum* o próprio desenvolvimento do fungo pode ter auxiliado nas condições para aumento da atividade enzimática.

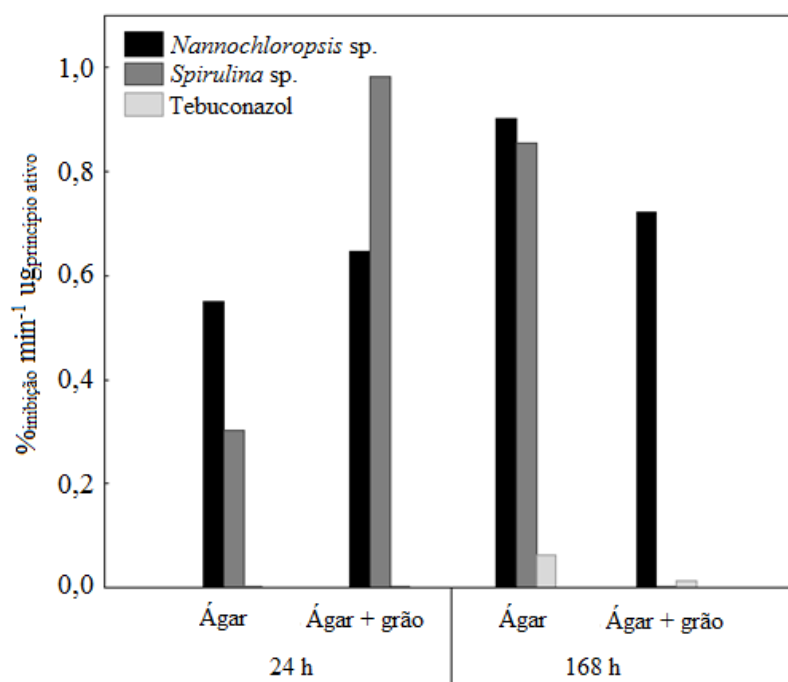
Tabela 3 - Redução (%) da atividade enzimática da α -amilase ($\mu\text{g}_{\text{amido hidrolisado}} \text{min}^{-1}$) e da concentração de ergosterol produzido em relação ao tratamento controle.

Meio de cultivo	Extrato fenólico <i>Nannochloropsis</i> sp.		Extrato fenólico <i>Spirulina</i> sp.		Tebuconazol	
	24 h	168 h	24 h	168 h	24 h	168 h
	Redução (%) na concentração de ergosterol					
Ágar	99	81	100	90	100	99
Ágar e grãos de trigo	29	80	76	75	29	72
Meio de cultivo	Extrato fenólico <i>Nannochloropsis</i> sp.		Extrato fenólico <i>Spirulina</i> sp.		Tebuconazol	
	24 h	168 h	24 h	168 h	24 h	168 h
	Redução (%) na atividade de α -amilase					
Ágar	50	82	24	69	ND*	78
Ágar e grãos de trigo	59	65	79	ND*	ND*	17

*ND: inibição não detectada.

Quando considerada a atividade enzimática específica (Figura 4), os tratamentos com os extratos naturais acarretaram elevada inibição da atividade da α -amilase, mostrando que quando considerada a concentração de fenólicos presentes no meio, estes se mostraram eficazes para inibir a α -amilase e dificultar o desenvolvimento da biomassa. A utilização do tebuconazol resultou em menores inibições enzimáticas específicas.

Figura 4 - Atividade específica da α -amilase ($\%_{\text{inibição}} \text{min}^{-1} \mu\text{g}_{\text{princípio ativo}}^{-1}$) nos diferentes tratamentos do cultivo *in vitro* da cepa CML 3607 do complexo *F. graminearum*.



3.1.4 Efeito dos extratos de microalgas na produção de micotoxinas em estudo *in vitro*

O efeito antimicotoxigênico da aplicação dos extratos contra a cepa CML 3607 (Tabela 4) mostrou ação principalmente contra o NIV, sendo que quando aplicado o extrato fenólico de *Nannochloropsis* sp. não foi detectado o pico característico da micotoxina em ambos os meios testados (sugerindo total inibição da sua produção), enquanto que utilizando o extrato de *Spirulina* sp. na presença de ágar e grãos de trigo, o NIV também não foi detectado ao final do período.

Na presença de ágar, a *Spirulina* sp. foi capaz de reduzir 64% da produção de NIV. Quando empregado o tebuconazol, houve redução de 26% na produção de NIV em meio contendo ágar, porém na presença de grãos de trigo ocorreu um aumento no teor da micotoxina, de aproximadamente 15%. Este resultado demonstra o que alguns autores já mencionaram sobre o estresse gerado ao fungo por fungicidas comerciais (MARÍN et al., 2013; MATEO et al., 2011). Quanto a produção de DON, ambos os extratos de microalgas também apresentaram efeito promissor, chegando a não detecção (com extrato de *Nannochloropsis* sp.) e redução de 62% (com extrato de *Spirulina* sp.) em substrato com grãos. Apesar de haver variabilidade entre os resultados, há comprovação do efeito anti-micotoxinas dos extratos de microalgas em experimentos *in vitro*. A aplicação do fungicida tebuconazol resultou em aumento da concentração de DON nos dois meios de cultivo estudados.

Quanto aos acetilados, tanto os extratos de microalgas quanto o tebuconazol inibiram sua produção, porém novamente os primeiros apresentaram elevados teores de inibição, chegando a 98% quando utilizado o extrato fenólico de *Nannochloropsis* sp. na presença de ágar e 78% para *Spirulina* sp. na presença de ágar e grãos de trigo. O tebuconazol atingiu a máxima inibição para os acetilados no meio somente com ágar, sendo igual a 63%

A variação do efeito inibidor para cada micotoxina se deve ao fato de que cada rota metabólica requer a expressão de uma proteína transportadora e uma rede de genes regulatórios, sendo que a síntese dos tricotecenos compreende a ciclização do anel sesquiterpeno, catalizada pela enzima tricodieno sintase, seguida de oito oxigenações e quatro esterificações. Essa sequência leva a formação das estruturas básicas como DON, NIV e seus acetilados (GARDA-BUFFON; BARAJ; BADIALE-FURLONG, 2010). A cepa do complexo *Fusarium* utilizada neste trabalho foi sensível ao efeito dos extratos em algum ponto desta rota, possivelmente pela complexação da proteína transportadora com os compostos fenólicos.

Tabela 4 - Efeito dos extratos fenólicos de microalgas e do fungicida comercial na produção dos tricotecnos nivalenol, deoxinivalenol e seus acetilados (determinados por HPLC-UV) pela cepa CML 3607 do complexo *F. graminearum* após 168 h de cultivo.

Meio de cultivo	NIV ($\mu\text{g kg}^{-1}$) (CV%)			
	Controle	<i>Nannochloropsis</i> sp.	<i>Spirulina</i> sp.	Tebuconazol
Ágar	113163 (10) ^a	ND*	40265 (6) ^c	83270 (13) ^b
Ágar e grãos de trigo	6019 (24) ^a	ND*	ND*	6934 (15) ^a
Meio de cultivo	DON ($\mu\text{g kg}^{-1}$) (CV%)			
	Controle	<i>Nannochloropsis</i> sp.	<i>Spirulina</i> sp.	Tebuconazol
Ágar	616813 (13) ^{ab}	491154 (22) ^{ab}	420110 (23) ^b	773428 (20) ^a
Ágar e grãos de trigo	1834 (16) ^a	ND*	701 (21) ^b	2004 (9) ^a
Meio de cultivo	ADONS ($\mu\text{g kg}^{-1}$) (CV%)			
	Controle	<i>Nannochloropsis</i> sp.	<i>Spirulina</i> sp.	Tebuconazol
Ágar	121741 (10) ^a	2837 (3) ^d	34243 (4) ^c	44779 (6) ^b
Ágar e grãos de trigo	1269 (13) ^a	310 (7) ^b	282 (12) ^b	832 (25) ^a

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *ND: micotoxina não detectada.

3.2 EFEITO DOS EXTRATOS DE MICROALGAS EM EXPERIMENTO *in vivo*

3.2.1 Qualidade do grão

Determinar os parâmetros de produtividade dos grãos é interessante para garantir a rentabilidade do processo, grãos sadios com composição inalterada ou até mesmo com melhoramentos benéficos.

No campo de Carmagnola, os parâmetros que não apresentaram variação quanto aos diferentes tratamentos foram: verdor da folha bandeira (com valores entre 0,58 e 0,62); proteína (12,9 a 13,8%); cinzas (1,8 a 1,9%); e glúten (9,3 a 10,6%). Dimmock e Gooding (2002) relataram que, se a cultura de trigo é mantida saudável, o período fotossintético é prolongado e mais nitrogênio é absorvido pela planta e pode ser translocado para os grãos. Por outro lado, condições que promovem a senescência foliar durante o enchimento de grãos, tais como doenças foliares, tendem a aumentar a deposição de proteína frente ao acúmulo de amido no grão, porque a produção e a translocação de hidratos de carbono para o grão é mais sensível a condições adversas de crescimento do que a produção de proteínas (FERNANDEZ-FIGARES et al., 2000). Ambos os efeitos poderiam desempenhar papel marcante neste

estudo, visto que danos metabólicos podem afetar a susceptibilidade da planta a fusariose. Os resultados mostraram que os tratamentos para evitar a doença não afetaram o teor de proteína nos grãos.

Em Buriasco, no ano de 2015, os parâmetros que apresentaram pequena variabilidade entre os diferentes tratamentos foram: verdor da folha bandeira (0,51 a 0,60), proteína (13,9 a 15,7%), cinza (1,1 a 2,5%) e glúten (12,8 a 15,1%). O maior efeito sobre esses valores foi quanto ao tipo de manejo do solo, sendo que no geral os grãos cultivados com o cultivo mínimo apresentaram os maiores teores de proteínas, cinzas e glúten na sua composição, quando comparados com aqueles cultivados em aração. No ano de 2016, esses parâmetros apresentaram variações iguais a: verdor da folha bandeira (0,60 a 0,68), proteína (12,3 a 14,2%), cinza (1,7 a 1,8%) e glúten (10,1 a 14%).

3.2.2 Parâmetros indicativos da contaminação no campo

Durante o cultivo foram avaliados alguns parâmetros de campo considerados importantes no que diz respeito ao efeito dos tratamentos aplicados contra a contaminação do grão de trigo por DON (Tabela 5). Tendo em vista que a presença da micotoxina é decorrente de uma contaminação fúngica e que sua determinação é realizada após a colheita, controlar a incidência de pragas que acometem as plantas no campo pode ser uma medida eficiente para elucidar o período de ação e capacidade protetora dos extratos aplicados.

Tanto a incidência quanto a severidade da fusariose mostraram-se afetadas significativamente com o emprego dos extratos naturais isoladamente, podendo ser comparados estatisticamente com o efeito do tebuconazol. Novamente se confirma o potencial dos extratos de microalgas para inibir o desenvolvimento fúngico, agora em escala de ambiente do cultivo de trigo. A incidência de septoriose foi reduzida significativamente somente com a aplicação de proticonazol, indicando que em todos os demais tratamentos as folhas das plantas não foram protegidas pelo procedimento adotado. A agressão às folhas atua como um foco inicial de contaminação fúngica, por esse motivo é importante controlar a dose exata de composto a ser aplicado para evitar a ocorrência do dano e isto pode ser melhor avaliado usando outras combinações de extratos de microalgas.

A produtividade dos grãos não mostrou variação sob os diferentes tratamentos. A aplicação de tebuconazol, sozinho ou em mistura com os extratos naturais foram os tratamentos aonde foi verificado aumento significativo na produtividade dos grãos. Aspecto importante porque permite reduzir o uso do fungicida e diminuir o risco de ocorrência do

resíduo tóxico no grão, além de reduzir o período de carência para o seu uso na cadeia de alimentos.

Tabela 5 - Influência dos tratamentos realizados na cultura de trigo no campo de Carmagnola nos parâmetros fusariose, septoriose, produtividade e concentração de deoxinivalenol.

Exp	Fusariose		Septoriose		Produtividade	DON ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ELISA	% redução	DON ($\mu\text{g kg}^{-1}$) MS-MS	% redução
	Incidência (%)	Severidade	Incidência (%)	Severidade					
Controle	69 ^a	4,5 ^a	95 ^a	28,0 ^a	4,8 ^c	3474 ^a		2960 ^a	
<i>Spirulina</i>	49 ^b	2,1 ^b	97 ^a	28,4 ^a	5,0 ^{bc}	3674 ^a	-	2021 ^{ab}	31,7
<i>Nannochloropsis</i>	47 ^{bc}	1,8 ^{bc}	99 ^a	23,4 ^{ab}	5,2 ^{abc}	3206 ^{ab}	7,7	2592 ^{ab}	12,4
Protioconazol	9 ^e	0,3 ^e	72 ^b	8,1 ^b	5,9 ^{abc}	1771 ^{abc}	49,0	1781 ^{ab}	39,8
Tebuconazol	34 ^{bcd}	1,0 ^{bcd}	90 ^{ab}	10,1 ^b	6,3 ^a	817 ^c	76,5	754 ^b	74,5
<i>Sp</i> + Teb	22 ^{de}	0,6 ^{de}	84 ^{ab}	8,5 ^b	6,3 ^{ab}	761 ^c	78,1	777 ^b	73,8
<i>No</i> + Teb	32 ^{bcd}	1,1 ^{cde}	99 ^a	14,4 ^{ab}	6,2 ^{ab}	1298 ^{bc}	62,5	1234 ^{ab}	58,3
½ Teb	37 ^{bcd}	1,2 ^{cd}	83 ^{ab}	9,8 ^b	5,5 ^{abc}	737 ^c	78,8	NR*	
<i>Sp</i> + ½ Teb	28 ^{cd}	0,8 ^{de}	84 ^{ab}	12,8 ^{ab}	5,8 ^{abc}	747 ^c	78,5	NR*	
<i>No</i> + ½ Teb	38 ^{bcd}	1,0 ^{cde}	99 ^a	13,9 ^{ab}	5,8 ^{abc}	918 ^c	73,6	NR*	

Sp: extrato fenólico de *Spirulina* sp.; *No*: extrato fenólico de *Nannochloropsis* sp.; Teb: Tebuconazol; ½ Teb: Tebuconazol na metade da dose recomendada.

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,10$). *NR = análise não realizada.

Considerando os resultados obtidos pelo método de ELISA, a concentração de DON foi estatisticamente reduzida quando foi empregado o tebuconazol. Esta redução foi observada igualmente quando empregado este fungicida sozinho, em mistura com os extratos naturais e quando usado em meia dose. Este resultado pode ser destacado, pois demonstra que com metade da concentração usual deste fungicida associando-se os extratos de microalgas se obtém resultados eficientes para inibição da micotoxina.

Quando utilizada a cromatografia com detector de massas, os extratos de microalgas promoveram redução média de 32% na produção de DON empregando o extrato fenólico de *Spirulina* sp. e de 12% quando utilizado o extrato de *Nannochloropsis* sp., indicando que estas microalgas apresentaram capacidade antimicotoxinas que deve ser melhor estudada quanto a concentração efetiva e estabilidade às condições de cultivo, para potencializar o seu efeito.

Comparativamente, os dois métodos utilizados para quantificar o DON forneceram diferentes resultados. Sabe-se que a espectrometria de massas fragmenta um composto puro que tenha sido proveiramente isolado (no caso deste estudo, por cromatografia

líquida), coleta os fragmentos dotados de carga elétrica de acordo com a relação massa/carga (m/z) e gera um histograma da abundância relativa de cada fragmento, o perfil característico e único conseguido para cada composto torna esse método mais seguro para confirmação de identidade. Enquanto que a quantificação pelo método de ELISA utiliza a reação antígeno-anticorpo para estimar a concentração de micotoxina através de imunoensaio enzimático competitivo, a utilização de cromogênico específico permite quantificar determinado composto fotometricamente. O quit utilizado apresentava 100% de especificidade para deoxinivalenol, >100% para 3-ADON, 19% para 15-ADON e 4% para NIV. Desta forma, apesar das vantagens do método de ELISA em termos de rapidez, facilidade de análise e estimativa da incidência de um grupo de micotoxinas em geral, sua principal utilidade é para realizar a sondagem inicial de incidência de contaminantes.

Os resultados obtidos para o campo de Buriasco estão na Tabela 6. Em 2015 a incidência de fusariose foi reduzida significativamente apenas quando empregados os fungicidas comerciais no cultivo com aração. Enquanto que no cultivo mínimo além dos fungicidas comerciais, o extrato fenólico de *Spirulina* sp. também apresentou redução significativa. Para o ano de 2016 apenas os tratamentos com tebuconazol e a mistura de tebuconazol e protioconazol diferiram do controle para os dois preparos do solo (Tabela 7).

A severidade da fusariose foi reduzida de forma similar, exceto pelo efeito do tebuconazol, que não foi significativo em ambos os preparos do solo, no ano de 2015, e o extrato fenólico de *Nannochloropsis* sp., que apresentou diferença do controle quando usado o cultivo mínimo. Quanto a septoriose, nenhum tratamento apresentou efeito na sua incidência, vale ressaltar que no ano de 2016 ocorreu forte injúria das plantas decorrente de condições climáticas desfavoráveis, fato que contribuiu para elevada incidência desta doença nas folhas. A produtividade dos grãos se manteve constante de forma geral, demonstrando que a aplicação dos extratos de microalgas não oferece risco ao valor comercial da produção dos grãos de trigo.

Em Buriasco no ano de 2015 a concentração de DON apresentou alterações significativas apenas com a utilização do tebuconazol, sozinho e em conjunto com o protioconazol. Para este mesmo ano, quanto aos extratos naturais, o maior teor de redução alcançado foi 12,5% quando usado o extrato de *Spirulina* sp. e 27,3% quando usada a *Nannochloropsis* sp.

Tabela 6 - Resultados dos tratamentos realizados na cultura de trigo no campo de Buriasco no ano de 2015.

Exp	Fusariose		Septoriose		Produtividade	DON ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ELISA	% redução	DON ($\mu\text{g kg}^{-1}$) MS-MS	% redução
	Incidência (%)	Severidade	Incidência (%)	Severidade					
Controle	53 ^a	2,6 ^a	89 ^a	40,8 ^a	6,6 ^a	1836 ^{ab}		1902 ^{ab}	
<i>Spirulina</i>	37 ^{abc}	2,4 ^a	88 ^a	37,8 ^a	6,7 ^a	1944 ^{ab}	-	2094 ^a	-
<i>Nannochloropsis</i>	45 ^{ab}	1,9 ^{ab}	92 ^a	33,1 ^a	7,0 ^a	2310 ^a	-	1607 ^{ab}	15,5
Tebuconazol	26 ^{bc}	0,8 ^b	85 ^a	5,4 ^c	8,0 ^a	1394 ^b	24,1	1379 ^b	27,5
Protioconazol	31 ^{bc}	1,3 ^{ab}	91 ^a	22,0 ^b	6,9 ^a	1722 ^{ab}	6,2	1707 ^{ab}	10,3
Teb + Prot	19 ^c	0,5 ^b	84 ^a	3,4 ^c	7,7 ^a	1491 ^b	18,8	NR*	
Controle	52 ^a	4,1 ^a	98 ^a	43,6 ^a	6,2 ^b	2745 ^a		2057 ^a	
<i>Spirulina</i>	36 ^{bc}	1,7 ^b	91 ^a	30,1 ^{ab}	6,8 ^{ab}	2431 ^{ab}	11,4	2142 ^a	12,5
<i>Nannochloropsis</i>	39 ^{ab}	1,9 ^{ab}	100 ^a	41,1 ^a	6,8 ^{ab}	1994 ^{ab}	27,3	2205 ^a	9,9
Tebuconazol	26 ^{bc}	0,8 ^b	100 ^a	11,0 ^c	7,8 ^a	1800 ^{ab}	34,4	1993 ^a	18,6
Protioconazol	36 ^{bc}	1,8 ^{ab}	94 ^a	17,2 ^{bc}	7,4 ^a	1884 ^{ab}	31,4	1795 ^a	26,7
Teb + Prot	24 ^c	0,8 ^b	93 ^a	5,7 ^c	7,5 ^a	1578 ^b	42,5	NR*	

Teb + Prot: mistura de tebuconazol e protioconazol. Letras diferentes na mesma coluna (de 1 a 6 e de 7 a 12, separadamente) indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,10$). *NR = análise não realizada.

Para o ano de 2016 os extratos naturais apresentaram maior efeito na produção de DON, chegando a 55% e 38% de redução quando empregado o extrato fenólico de *Spirulina* sp. e *Nannochloropsis* sp., respectivamente. Neste caso, quando utilizado o cultivo mínimo, os tratamentos com extratos de microalgas mostraram-se estatisticamente iguais a aplicação de protioconazol.

Em relação ao campo anterior (Carmagnola), e até mesmo entre os anos de cultivo, os valores de inibição na produção de DON pelos compostos naturais apresentaram variabilidade, o que comprova a viabilidade de aplicá-los, porém, mediante o estabelecimento de protocolo quali- e quantitativo e de periodicidade da aplicação em condições reais de cultivo. Existem muitos fatores ambientais que não podem ser controlados, como precipitação, vento, temperaturas e outros, portanto a formulação do princípio ativo como emulsão, aquoso ou encapsulado precisa ser estudada.

O teor dos ácidos fenólicos nos grãos de trigo das culturas de 2015 (Tabela 8) mostrou elevada variabilidade entre as réplicas de cada tratamento, contudo, não se observou diferença significativa em relação a nenhum tratamento, isso indica que todo o extrato fenólico borrifado na planta foi metabolizado por ela ou degradado por fatores ambientais.

Tabela 7 - Resultados dos tratamentos realizados na cultura de trigo no campo de Buriasco no ano de 2016.

Exp		Fusariose		Septoriose		Produtividade	DON ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ELISA	% redução
		Incidência (%)	Severidade	Incidência (%)	Severidade			
Controle	Aração	57 ^a	8,2 ^{ab}	100 ^a	48,5 ^a	7,3 ^a	374 ^a	
<i>Spirulina</i>		53 ^a	8,1 ^{ab}	100 ^a	48,3 ^a	7,3 ^a	168 ^a	55,1
<i>Nannochloropsis</i>		63 ^a	9,6 ^a	100 ^a	46,4 ^a	7,0 ^a	232 ^a	38,0
Tebuconazol		32 ^b	1,4 ^c	100 ^a	33,2 ^b	7,5 ^a	352 ^a	5,9
Protioconazol		57 ^a	6,3 ^b	100 ^a	44,7 ^a	7,4 ^a	218 ^a	41,7
Teb + Prot		27 ^b	1,9 ^c	100 ^a	30,8 ^b	7,7 ^a	42 ^a	88,8
Controle	Cultivo mínimo	62 ^a	10,2 ^a	100 ^a	41,8 ^a	7,2 ^{ab}	1171 ^a	
<i>Spirulina</i>		63 ^a	6,6 ^{ab}	100 ^a	41,2 ^a	7,1 ^{ab}	747 ^b	36,2
<i>Nannochloropsis</i>		49 ^a	4,8 ^{bc}	100 ^a	41,9 ^a	6,7 ^b	799 ^b	31,8
Tebuconazol		28 ^b	2,2 ^{bc}	100 ^a	25,0 ^b	7,5 ^{ab}	342 ^c	70,8
Protioconazol		56 ^a	6,8 ^{ab}	100 ^a	34,1 ^{ab}	7,5 ^a	862 ^{ab}	26,4
Teb + Prot		21 ^b	1,6 ^c	100 ^a	27,3 ^b	7,2 ^{ab}	269 ^c	77,0

Teb + Prot: mistura de tebuconazol e protioconazol. Letras diferentes na mesma coluna (de 1 a 6 e de 7 a 12, separadamente) indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,10$). *NR = análise não realizada.

3.3 ESTIMATIVA DA DOSE RECOMENDADA

Considerando os volumes de extratos utilizados nos experimentos e a área das placas de petri e das parcelas do campo onde foram realizados os tratamentos, foi estimada a dose usada em cada caso e suas respectivas eficiências (Tabela 9). Pode-se observar que a dose utilizada em campo foi cinco vezes menor do que no experimento *in vitro*. Esta ainda é uma limitação na utilização da biomassa de microalgas para fins de extração de componentes traços, tendo em vista que o rendimento a partir da biomassa de microalga coletada ainda é pequeno, necessitando aperfeiçoamento na forma de cultivo deste micro-organismos para maior produção do composto de interesse. Possivelmente o protocolo de extração da biomassa possa ser reajustado para melhor recuperação dos compostos fenólicos.

Apesar da utilização da dose em campo representar apenas 19% daquela aplicada *in vitro*, os extratos fenólicos de *Nannochloropsis* sp. e *Spirulina* sp. mantiveram 25% e 43% das suas eficiências, respectivamente. Esses resultados indicaram que quando aplicados em

maiores quantidades, sua eficiência tende a aumentar promissoriamente, com a vantagem de não degradar o meio ambiente.

Tabela 8 - Concentração de ácidos fenólicos [$\mu\text{g g}^{-1}$ (CV%)] encontrada nos grãos de trigo cultivados sob diferentes tratamentos.

Tratamento	Campo Carmagnola		Tratamento	Campo Buriasco
Controle	42,8 (48) ^a	Aração	Controle	43,3 (12) ^a
<i>Spirulina</i> sp.	41,0 (51) ^a		<i>Spirulina</i> sp.	46 (16) ^a
<i>Nannochloropsis</i> sp.	34,3 (51) ^a		<i>Nannochloropsis</i> sp.	53 (11) ^a
Protioconazol	54,3 (10) ^a		Tebuconazol	41 (19) ^a
Tebuconazol	52,5 (40) ^a		Protioconazol	50 (13) ^a
<i>Spirulina</i> sp. + Tebuconazol	46 (50) ^a		Teb + Prot	44 (18) ^a
<i>Nannochloropsis</i> + Tebuconazol	46 (10) ^a	Cultivo mínimo	Controle	43 (2) ^a
½ Tebuconazol	32 (31) ^a		<i>Spirulina</i> sp.	31 (41) ^a
<i>Spirulina</i> sp. + ½ Tebuconazol	31 (50) ^a		<i>Nannochloropsis</i> sp.	48 (0,4) ^a
<i>Nannochloropsis</i> + ½ Tebuconazol	54 (26) ^a		Tebuconazol	27 (38) ^a
			Protioconazol	34 (6) ^a
			Teb + Prot	32 (29) ^a

Letras diferentes entre as linhas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,10$).

4 CONCLUSÃO

Os extratos fenólicos de microalgas mostraram potencial antifúngico e antimicotoxigênico nas culturas de trigo *in vitro*, com eficiência média de inibição da produção de tricotecenos de 82 e 68% para os tratamentos com *Nannochloropsis* sp. e *Spirulina* sp., respectivamente, enquanto o tebuconazol foi menos eficiente para prevenir a produção de tricotecenos. Os extratos que foram aplicados no cultivo de trigo em campo e mostraram-se eficientes contra a fusariose e na manifestação do potencial toxigênico demonstrado pela redução em 38% da produção de DON pelo extrato fenólico de *Nannochloropsis* sp. e 55% pelo extrato de *Spirulina* sp.. A combinação com fungicida convencional é viável para mitigar os danos ao ambiente. Contudo a redução da capacidade micotoxigênica promovida pelos extratos de microalgas, nas condições naturais, indica que é promissor investir em tecnologia para melhorar a eficiência deles.

Tabela 9 - Dados demonstrativos da eficiência da dose dos extratos fenólicos de microalgas aplicados em experimentos *in vitro* e em campo.

Extrato	Experimento <i>in vitro</i>				Experimento em campo			
	Volume de extrato (mL)	Área tratada (m ²)	Dose (mL m ⁻²)	Eficiência média de inibição (%)*	Volume de extrato (mL)	Área tratada (m ²)	Dose (mL m ⁻²)	Eficiência média de inibição (%)*
<i>Nannochloropsis</i> (45,2 µg mL ⁻¹)	2	0,0314	63,7	82	8000	648	12,3	20,4
<i>Spirulina</i> sp. (40,0 µg mL ⁻¹)	2	0,0314	63,7	68	8000	648	12,3	29,4

*valor estimado pela média de todas as reduções da concentração de micotoxinas encontrada para cada extrato.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412-431, 2003.

AOKI, T.; WARD, T. J.; KISTLER, H. C.; O'DONNELL, K. Systematics, phylogeny and trichothecene mycotoxin potential of *Fusarium* head blight cereal pathogens. **Mycotoxins**, v. 62, n. 2, p. 91-102, 2012.

BARAJ, E.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Influence of the trichothecenes DON and T-2 toxin in malt aminolytic enzymes activity. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.53, p. 14, 2010.

BLANDINO, M.; HAIDUKOWSKI, M.; PASCALE, M.; PLIZZARI, L.; SCUDELLARI, D.; REYNERI, A. Integrated strategies for the control of *Fusarium* head blight and deoxynivalenol contamination in winter wheat. **Field Crops Research**, v. 133, p. 139-149, 2012.

BRYDEN, W. L. Mycotoxins in the food chain: human health implications. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 16, n. 1, p. 95-101, 2007.

DALCERO, A.; TORRES, A.; ETCHEVERRY, M.; CHULZE, S.; VARSAVSKY, E. Occurrence of deoxynivalenol and *Fusarium graminearum* in Argentina wheat. **Food Additives and Contaminants**, v. 14, n. 1, p. 11-14, 1997.

DANYAL, A.; MUBEEN, U.; MALIK, K. A. Investigating two native algal species to determine antibiotic susceptibility against some pathogens. **Current Research Journal of Biological Science**, v. 5, p. 70-74, 2013.

DIMMOCK, J. P. R. E.; GOODING, M. J. The effect of fungicides on rate and duration of grain filling in winter wheat in relation to maintenance of flag leaf green area. **Journal of Agricultural Science**, v. 138, p. 1-16, 2002.

- DORS, G. C.; PRIMEL, E. G.; FAGUNDES, C. A.; MARIOT, C. H. P.; BADIALE-FURLONG, E. Distribution of pesticides in rice grain and rice bran. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 1921-1930, 2011.
- EHLING, G.; COCKBURN, A.; SNOWDON, P.; BUCHHAUS, H. The significance of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol (DON) for human and animal health. **Cereal Research Communications**, v. 146, n. 6, p. 443-447, 1998.
- EL-HOSSARY, E. M.; CHENG, C.; HAMED, M. M.; HAMED, A. N. E.; OHLSEN, K.; HENTSCHEL, U.; ABDELMOHSEN, U. R. Antifungal potential of marine natural products. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.126, 631-651, 2017.
- FERNANDEZ-FIGARES, I. ; MARINETTO, J. ; ROYO, C. ; RAMOS, J. M.; GARCIA DEL MORAL, L. F. Amino-acid composition and protein and carbohydrate accumulation in the grain of triticale grown under terminal water stress simulated by a senescing agent. **Journal of Cereal Science**, v. 32, p. 249-258, 2000.
- FREITAS, R. F.; SCHRACK, E. C.; HE, Q.; SILLIMAN, B. R.; FURLONG, E. B.; TELLES, A.C.; COSTA, C. S. B. Consumer control of the establishment of marsh foundation plants in intertidal mudflats. **Marine Ecology Progress Series**, v. 547, p. 79-89, 2016.
- GARDA-BUFFON, J.; BARAJ, E.; BADIALE-FURLONG, E. Effect of deoxynivalenol and T-2 toxin in malt amylase activity. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 505-511, 2010.
- GUTAROWSKA, B.; ZAKOWSKA, Z. Mathematical models of mycelium growth and ergosterol synthesis in stationary mould culture. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p. 605-610, 2009.
- HEIDTMANN-BEMVENUTI, R., TRALAMAZZA, S.M., FERREIRA, C.F.J., CORRÊA, B. AND BADIALE-FURLONG, E. Effect of natural compounds on *Fusarium graminearum* complex. **Journal of the Science of Food Agriculture**, v. 96, n. 12, p. 3998-4008, 2016.
- HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; HACKBART, H. C. S.; SOUZA, M. M.; DORS, G. C.; FAGUNDES, C. A.; BADIALE-FURLONG, E. Determinação de deoxinivalenol e zearalenona em arroz natural e parboilizado e suas frações utilizando QuEChERS e HPLC/UV-FL. **Química Nova**, v. 35 , p.1-6, 2012.
- HUSSEIN, A. I.; ANWAR, F.; NIGAM, P. S.; SARKER, S. D.; MOORE, J. E.; RAO, J. R.; MAZUMDAR, A. Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, p. 1199-1206, 2001.
- JORDAN, C. F. Derivation of leaf area index from quality of light on the forest floor. **Ecology**, v. 50, p. 663-666, 1969.
- KONIETZNY, U.; GREINER, R. The application of PCR in the detection of mycotoxigenic fungi in foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 283-300, 2003.

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.

MARÍN, P.; ORY, A.; CRUZ, A.; MAGAN, N.; GONZÁLEZ-JAÉN, M. T. Potential effects of environmental conditions on the efficiency of the antifungal tebuconazole controlling *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* growth rate and fumonisina biosynthesis. **International Journal of Food Microbiology**, v.165, n. 3, p. 251-258, 2013.

MATEO, E. M.; VALLE-ALGARRA, F. M.; MATEO, R.; JIMÉNEZ, M.; MAGAN, N. Effect of fenpropimorph, prochloraz and tebuconazole on growth and production of T-2 and HT-2 toxins by *Fusarium langsethiae* in oat-based medium. **International Journal of Food Microbiology**, v.151, n. 3, p. 289-298, 2011.

MUGRABI- DE- KUPPLER, A. L., STEINER, U., SULYOK, M., KRSKA, R., OERKE, E. C. Genotyping and phenotyping of *Fusarium graminearum* isolates from Germany related to their mycotoxin biosynthesis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, p. 78–86, 2011.

MURALIKRISHNA, G.; NIRMALA, M. Cereal α -amylases: an overview. **Carbohydrate polymers**, v. 60, p. 163-173, 2005

NELSON, L. R.; MARSHALL, D. Breeding wheat for resistance to *Septoria nodorum* and *Septoria tritici*. **Advances in Agronomy**, v. 44, p. 257-277, 1990.

PAGNUSSATT, F. A.; BRETANHA, C. C.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Extraction of fungal amylase inhibitors from cereal using response surface methodology. **International Research Journal Agricultural Science and Soil Science**, v. 1, p. 428-434, 2011.

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

PAGNUSSATT, F. A.; DE LIMA, V. R.; DORA, C. L.; COSTA, J. A. V.; PUTAUX, J. L.; BADIALE-FURLONG, E. Assessment of the encapsulation effect of phenolic compounds from *Spirulina* sp. LEB-18 on their antifusarium activities. **Food Chemistry**, v. 211, p. 616-623, 2016.

PARRY, D. W.; JENKINSON, P.; MCLEOD, L. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals: A review. **Plant Pathology**, v. 44, p. 207-238, 1995.

REIS, E. M.; BRUSTOLIN, R.; DE ROSSI, R.; BOLLER, W. Avanços na tecnologia de aplicação de fungicida visando ao controle da giberela em trigo. **Revista plantio direto**, ano XXI, ed. 133, p. 28-32, 2013.

ROUSE, J. W.; HAAS, R. H.; SCHELL, J. A.; DEERING, D. W.; HARLAN, J. C. **Monitoring the vernal advancements and retrogradation of nature vegetation**. In: NASA/GSFC Final Report, Ed. MD, p. 371, 1974.

SAMAPUNDO, S.; MEULENAER, B.; OSEI-NIMOH, D.; LAMBONI, Y.; DEBEVERE, J.; DEVLIEGHERE, F. Can phenolic compounds be used for the protection of corn from fungal invasion and mycotoxin contamination during storage? **Food Microbiology**, v. 24, p. 465-473, 2007.

SCARPINO, V.; REYNERI, A.; SULYOK, M.; KRSKA, R.; BLANDINO, M. Effect of fungicide application to control *Fusarium* head blight and *Fusarium* and *Alternaria* mycotoxins in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). **World Mycotoxin Journal**, v. 8, n. 4, p. 499-510, 2015.

SEUS, E. R. **Otimização de método para a determinação de tricotecenos em amostras de trigo**. 2014. 122f. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

SHAH, D. A.; BERGSTROM, G. C.; SORELLS, M. E. Differential seed infection of wheat cultivars by *Stagonospora nodorum*. **Plant Disease**, v. 84, p. 749-752, 2000.

SNIJEDERS, C. H. A. *Fusarium* head blight and mycotoxin contamination of wheat, a review. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 96, n. 4, p. 187-198, 1990.

SOUZA, M. M.; PRIETO, 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, p. 1050-1058, 2011.

SOVRANI, V.; BLANDINO, M.; SCARPINO, V.; REYNERI, A.; COISSON, J. D.; TRAVAGLIA, F.; LOCATELLI, M.; BORDIGA, M.; MONTELLA, R.; ARLORIO, M. Bioactive compound content, antioxidant activity, deoxynivalenol and heavy metal contamination of pearled wheat fractions. **Food Chemistry**, v. 135, p. 39-46, 2012.

WIANOWSKA, D.; GARBACZEWSKA, S.; CIENIECKA-ROSLONKIEWICZ, A.; DAWIDOWICZ, A. L.; JANKOWSKA, A. Comparison of antifungal activity of extracts from different *Juglans regia* cultivars and juglone. **Microbial Pathogenesis**, v. 100, p. 263-267, 2016.

XU, S. S.; FRIESEN, T. L.; CAI, X. **Sources and genetic control of resistance to *Stagonospora nodorum* blotch in wheat**. In: Research Signpost/recent research development in genetics and plant breeding. Book Chapter. v. 1, p. 449-469, 2004.

ZAO, Z.; WANG, Q.; WANG, K.; BRIAN, K.; LIU, C.; GU, Y. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 292-297, 2010.

**ARTIGO IV - IMPACTO DA APLICAÇÃO DE ANTIFÚNGICOS DE
MICROALGAS NA PRODUÇÃO DE FUMONISINAS EM MILHO CULTIVADO
NO NOROESTE DA ITÁLIA**

RESUMO

Extratos fenólicos de microalgas foram aplicados em culturas de milho durante as fases de florescimento e grão leitoso, a fim de verificar qual o melhor período para que atuassem mitigando a contaminação fúngica e a produção de fumonisinas B₁ e B₂. Foi realizado um ensaio *in vitro* contra isolado de *Fusarium fujikuroi* utilizando grãos de milho verde e milho seco como meio de cultivo. Neste caso os extratos de microalgas apresentaram seus melhores resultados quando foi utilizado o milho seco juntamente com o ágar no meio de cultivo da cepa fúngica, 64 e 18% de inibição do halo, 54 e 66% de redução na atividade enzimática da α -amilase e 77 e 74% de redução na produção de ergosterol, para os extratos fenólicos de *Nannochloropsis* sp. e *Spirulina* sp., respectivamente. Além disso, os extratos naturais reduziram 95% a produção de fumonisina B₁, enquanto que com o tebuconazol ocorreu redução de 53%. Nos experimentos em campo os extratos fenólicos de microalgas apresentaram maior capacidade antimicotoxigênica quando aplicados em conjunto com inseticida na fase de florescimento da planta, obtendo-se valores acima de 90% de inibição da produção de fumonisina B₁ e 82% de fumonisina B₂ com relação ao controle. Os resultados demonstraram que foi viável a aplicação dos extratos fenólicos de microalgas em maior escala para proteger as culturas de milho de fungos toxigênicos e seus impactos.

Palavras-chave: Fumonisina. *Zea mays*. *Fusarium fujikuroi*. *Nannochloropsis* sp. *Spirulina* sp.

1 INTRODUÇÃO

O *Fusarium verticillioides* é o patógeno mais comumente encontrado em milho, que causa doenças nas espigas e provoca a síntese de fumonisinas nos grãos. Esta produção é influenciada por condições ambientais e insumos agrícolas aplicados durante o crescimento e maturação da planta (BLANDINO et al., 2009; SALADINI et al., 2008). A infestação de *Ostrinia nubilalis*, popularmente conhecida como broca do colmo, desempenha um papel importante na promoção de contaminação por *F. verticillioides* e *F. proliferatum* (SOBEK; MUNKVOLD, 1999). O controle da broca do colmo é uma das mais importantes medidas para conter a contaminação destas espécies fúngicas, e a consequente produção de fumonisinas nos grãos de milho (BLANDINO et al., 2015).

O uso de fungicidas nem sempre é suficientemente rentável para a cultura do milho, dependendo, na maioria das vezes, do potencial de rendimento dos grãos, da susceptibilidade às doenças do híbrido em estudo, da severidade da doença foliar durante todo o período de crescimento, do preço do milho no mercado e do preço para a aplicação do fungicida (BLANDINO et al., 2012). Além disso, o efeito potencial destes tratamentos sobre doenças de podridão fúngica e contaminação por micotoxinas ainda precisa ser melhor compreendido, pois a ação do fungicida pode também influenciar a relação entre os fungos toxigênicos e não toxigênicos (PIRGOZLIEV et al., 2003). Portanto, quando os fungicidas são aplicados a culturas de cereais, suas implicações na produção de micotoxinas devem ser consideradas. Uma alternativa consiste na aplicação de fungicidas em mistura com inseticidas, que podem controlar a doença foliar de forma mais eficiente durante a última parte da maturação e preservar o tecido foliar verde por mais tempo, proporcionando um efeito "verde" às culturas (BLANDINO et al., 2012).

Tendo em vista a elevada incidência de fumonisinas nos grãos de milho, a alta toxicidade atribuída a ela, os prejuízos acarretados por perdas na produção e os danos à saúde causados por esses compostos (ALBONICO et al., 2017; FERNÁNDEZ-BLANCO et al., 2016; GUO et al., 2016), foram aplicados antifúngicos naturais extraídos de microalgas, na presença e ausência de inseticidas, no cultivo do milho em diferentes estádios de desenvolvimento da planta (florescimento e grão leitoso) visando reduzir os teores de fumonisina B₁ (FB₁) e fumonisina B₂ (FB₂) nos grãos, bem como avaliar a melhor fase para aplicação eficiente dos antifúngicos naturais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

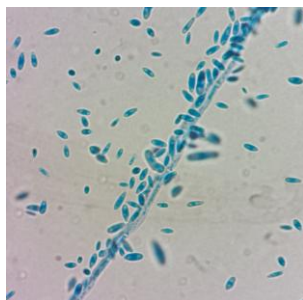
2.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS FENÓLICOS DE MICROALGAS

Os extratos contendo os ácidos fenólicos de ambas as microalgas foram obtidos conforme procedimento descrito no Artigo II (PAGNUSSATT et al., 2014; SCAGLIONI et al., 2014). O teor de ácidos fenólicos também foi determinado nas amostras de milho submetidas a diferentes tratamentos no campo.

2.2 CAPACIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS DE MICROALGAS *in vitro* CONTRA CEPA DE *Fusarium fujikuroi*

O experimento *in vitro* foi conduzido em placas de petri contendo 10 mL de ágar ou 3 mL de solução nutritiva (composta por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 e MgSO_4) e 19 g de grãos de milho verde ou milho seco previamente esterilizados em autoclave. Cada tratamento consistiu em adicionar o volume de extrato de microalgas com concentração correspondente ao valor de EC_{50} (estimado no Artigo II, em torno de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$) e posterior inoculação de um disco de micélio da cepa de *F. fujikuroi* (1,1 mm de diâmetro) no centro de cada placa. Este isolado foi proveniente do cultivo de milho em campos experimentais situados na Itália, a Figura 1 mostra a cepa isolada em microscópio. O cultivo do controle foi conduzido na ausência dos extratos. Também foi realizado um tratamento com o fungicida tebuconazol na dose usual recomendada ($0,6 \text{ mg mL}^{-1}$). As placas de Petri com o inóculo foram incubadas a 25°C , fotoperíodo claro / escuro de 12-12 h. A eficácia dos tratamentos foi avaliada diariamente durante sete dias, medindo o diâmetro do desenvolvimento da hifa ortogonalmente. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Figura 1 - Cepa de *Fusarium fujikuroi* visualizada no microscópio.



2.3 ATIVIDADE DA α -AMILASE

A extração da enzima α -amilase e determinação da sua atividade foram determinadas conforme procedimento descrito no Artigo III (BARAJ; GARDA-BUFFON; BADIALE-FURLONG, 2010).

2.4 APLICAÇÃO DOS EXTRATOS DE MICROALGAS NO CULTIVO DE MILHO

Foram utilizados dois campos experimentais distintos (Micoprincem e Cordero), situados no noroeste da Itália, sendo empregada a variedade do grão P1547 e período de cultivo de julho a setembro de 2015. Em ambos os campos foram aplicados os extratos de microalgas e o fungicida comercial (Prosaro, que consiste em uma mistura de tebuconazol e prothioconazol em proporções iguais) nas fases de florescimento e de grão leitoso.

A aplicação foi realizada de forma manual, utilizando de aplicadores com fluxo controlado que resultou em 10 mL de extrato borrifado por planta. Em Micoprincem também foi avaliada a utilização concomitante de inseticida, resultando em 16 experimentos (Tabela 1). Enquanto que em Cordero foi avaliada a preparação do solo como outro fator, sendo utilizada a aração ou cultivo mínimo, resultando também em 16 experimentos (Tabela 2). Todos os tratamentos foram realizados em triplicata.

2.5 BROCA DO COLMO (*Ostrinia nubilalis*) E PRESENÇA FÚNGICA

Durante a maturação do grão foram avaliadas a incidência e a severidade de *O. nubilalis* e de mofos em geral (sub classificados de acordo com a coloração: branco-rosado, vermelho, escuros e verde) na espiga.

A incidência do ataque de *O. nubilalis* foi calculada como o percentual de espigas que apresentaram os sintomas da atividade das larvas da traça. Da mesma forma foi avaliada a presença de contaminação fúngica em geral, ambas realizadas por análise visual, utilizando 10 espigas ao acaso. A severidade de ambos os ataques foi calculada como o percentual da superfície da espiga que apresentou sintomas visíveis (SALADINI et al., 2008).

Tabela 1 - Tratamentos utilizados para o milho no campo de Micoprinçem.

Experimento	Fase	Uso de inseticida	Tratamento
1	Florescimento	Não	Controle
2			<i>Spirulina</i> sp. (40,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$)
3			<i>Nannochloropsis</i> sp. (45,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$)
4			Prosaro*
5		Sim	Controle
6			<i>Spirulina</i> sp. (40,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$)
7			<i>Nannochloropsis</i> sp. (45,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$)
8			Prosaro*
9	Grão leitoso	Não	Controle
10			<i>Spirulina</i> sp. (40,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$)
11			<i>Nannochloropsis</i> sp. (45,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$)
12			Prosaro*
13		Sim	Controle
14			<i>Spirulina</i> sp. (40,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$)
15			<i>Nannochloropsis</i> sp. (45,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$)
16			Prosaro*

*Tebuconazol (200 g i.a. ha⁻¹) + Protiocanazol (200 g i.a. ha⁻¹). g i. a. ha⁻¹: grama de ingrediente ativo por hectare.

2.6 PARÂMETROS PRODUTIVOS E DE COMPOSIÇÃO DO GRÃO DE MILHO

Após a realização da colheita foram determinados alguns parâmetros que permitem verificar se os tratamentos acarretaram em aumento na produção de grãos, sendo eles: umidade e peso hectolitro, através do analisador de grãos Dickey-John GAC2100 (Corp. Auburn, IL, USA) e o peso de mil grãos, onde foram coletados aleatoriamente duzentos grãos a partir de cada amostra que pesava 1 kg.

O teor de proteínas, cinzas, amido, fibras, lipídeos e umidade contido nas amostras foi determinado pela tecnologia de transmissão de infravermelho próximo, usando um Infratec TM 1241 Grain Analyser instrument (Foss, Silver Spring, MD, USA), sendo apresentados os valores com base em matéria seca.

Tabela 2 - Tratamentos utilizados para o milho no campo de Cordero.

Experimento	Fase	Manejo do solo	Tratamento
1	Florescimento	Aração	Controle
2			<i>Spirulina</i> sp. (40,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$)
3			<i>Nannochloropsis</i> sp. (45,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$)
4			Prosaro*
5		Cultivo mínimo	Controle
6			<i>Spirulina</i> sp. (40,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$)
7			<i>Nannochloropsis</i> sp. (45,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$)
8			Prosaro*
9	Grão leitoso	Aração	Controle
10			<i>Spirulina</i> sp. (40,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$)
11			<i>Nannochloropsis</i> sp. (45,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$)
12			Prosaro*
13		Cultivo mínimo	Controle
14			<i>Spirulina</i> sp. (40,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$)
15			<i>Nannochloropsis</i> sp. (45,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$)
16			Prosaro*

*Tebuconazol (200 g i.a. ha⁻¹) + Protiocanazol (200 g i.a. ha⁻¹) g i. a. ha⁻¹: grama de ingrediente ativo por hectare.

2.7 DETERMINAÇÃO DE FUMONISINAS B₁ E B₂ (FB₁ E FB₂)

Para o experimento *in vitro* apenas a Fumonisina B₁ foi determinada. A extração foi realizada pelo método de QuEChERS, utilizando 2 g de amostra previamente moída com adição de 10 mL de água destilada e 10 mL de acetonitrila acidificada 0,5% com ácido acético. A mistura foi levada ao agitador orbital a 300 rpm por 30 min, posteriormente foram adicionados os sais para auxiliar a extração (4 g de MgSO₄ e 1 g de NaCl), e após homogeneização o conteúdo foi centrifugado a 3220 g a 20 °C por 15 min. Foram recolhidos 5 mL do sobrenadante, a este foram adicionados 5 mL de hexano e procedeu-se a mistura em vórtex por 1 min. Por fim o conteúdo foi centrifugado novamente (3220 g, 20 °C por 1 min) e a fase de acetonitrila foi recolhida (5 mL) e transferida para frasco âmbar e o conteúdo foi seco em banho-maria a 50 °C (ANASTASSIADES et al., 2003, modificado por DESMARCHELIER et al., 2010).

A quantificação foi realizada em Cromatógrafo Líquido Alliance Separations modelo 2695 Waters (Milford, MA, USA) equipado com amostrador automático, bomba quaternária, sistema de desgaseificação, Detector MS, Micromass® Quatro Micro™ API Waters com fonte API, utilizando o modo de ionização por Electrospray, Sistema de aquisição de dados através do software Masslynx 4.0 Waters e coluna analítica Atlantis® HILIC sílica 3,0 μm (50 $\times$ 4.6 mm d.i.). As condições do espectrômetro de massas foram: temperatura da fonte de ionização a 110°C, temperatura do gás de dessolvatação (N_2) de 500°C, vazão do gás de dessolvatação de 500 L h^{-1} e vazão do gás do cone de 50 L h^{-1} . A voltagem do capilar foi de 4 kV. A fase móvel utilizada foi composta por água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B) com vazão de 0,4 mL min^{-1} e eluição no modo gradiente (0 – 2 min: 5% (A) e 95% (B); 2 – 5 min: 95% (A) e 5% (B); 5,5 – 10 min: 5% (A) e 95% (B)). As condições de fragmentação através da transição massa/carga (m/z) que relacionou o íon precursor com o íon de produto foi 722>334,1, utilizada para a quantificação, com modo de ionização (ESI) positivo, voltagem do cone 50 V e energia de colisão 40 eV. Para quantificação foi utilizada curva padrão com equação igual a $y=3608,71x - 172,165$ (linearidade de 0,05 a 1,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Para as amostras de milho provenientes do cultivo no campo, o conteúdo de FB₁ e FB₂ foi determinado usando 50 g de amostra moída com 100 mL de uma solução de metanol:água (80:20 v/v), mantidos em agitação por 20 min. Após filtração em papel Whatman® nº1 foi realizada diluição com tampão fosfato salino (PBS) para posterior etapa de purificação, mediante emprego de colunas de imunoafinidade FUMtest (VICAM®). Para tal foi utilizado sistema a vácuo com fluxo de 1 gota s^{-1} , 5 mL do extrato foi eluído pela coluna, logo após 2,5 mL de PBS, e o analito foi recuperado com 2 mL de metanol puro que foi utilizado para injeção em HPLC-MS/MS, com bomba cromatográfica Varian 212-LC, coluna Varian, Pursuit 5 C18 50x2,1 mm, auto amostrador ProStar 410 e espectrômetro de massas triplo quadrupolo 310-MS.

A corrida cromatográfica teve duração de 15 min (t_R FB₁ = 4,9 min; t_R FB₂ = 5,6 min), utilizando acetonitrila e água acidificada 0,1% com ácido acético como fase móvel. Com o emprego de um triplo quadrupolo foram identificadas as FB com a fonte de ionização eletrospray na modalidade de íon positivo. A molécula de FB₁ protonada foi fragmentada em seus íons produtos a 318 m z^{-1} (utilizado para a identificação) e 336 m z^{-1} (utilizado para a quantificação). Enquanto que para a FB₂ foram utilizados 334 m z^{-1} (íons produto utilizado para a identificação) e 352 m z^{-1} (utilizado para a quantificação) (BLANDINO et al., 2015).

2.8 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE ERGOSTEROL

O método modificado de Gutarowska e Zakowska (2009) foi utilizado para a determinação do teor de ergosterol nas amostras dos experimentos *in vitro* e *in vivo*. Este consistiu em misturar 0,2 g de amostra e 10 mL de metanol em agitador orbital a 200 rpm durante 30 min (três vezes). O extrato metanólico foi centrifugado a 3200 *g* a 20 °C durante 10 min. Em seguida, aqueceu-se sob refluxo durante 30 min e arrefeceu-se a 4 °C. O material submetido a refluxo foi submetido a quatro partições com 20 mL de hexano. A fração de hexano foi seca em evaporador rotativo a 60 °C. O resíduo foi dissolvido com metanol e determinado por cromatografia (Shimadzu, Tóquio, Japão, CLASSE-M10A) acoplado com detector de UV e coluna de fase reversa C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm, Discovery, EUA). O HPLC-UV operou a vazão de 0,8 mL min⁻¹, a 30 °C, utilizando fase móvel 100% de metanol durante 17 min, com detecção a 282 nm. O teor de ergosterol foi estimado por uma curva de calibração com padrão comercial com concentrações variando de 0,05 a 2,0 µg mL⁻¹ (FREITAS et al., 2016).

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

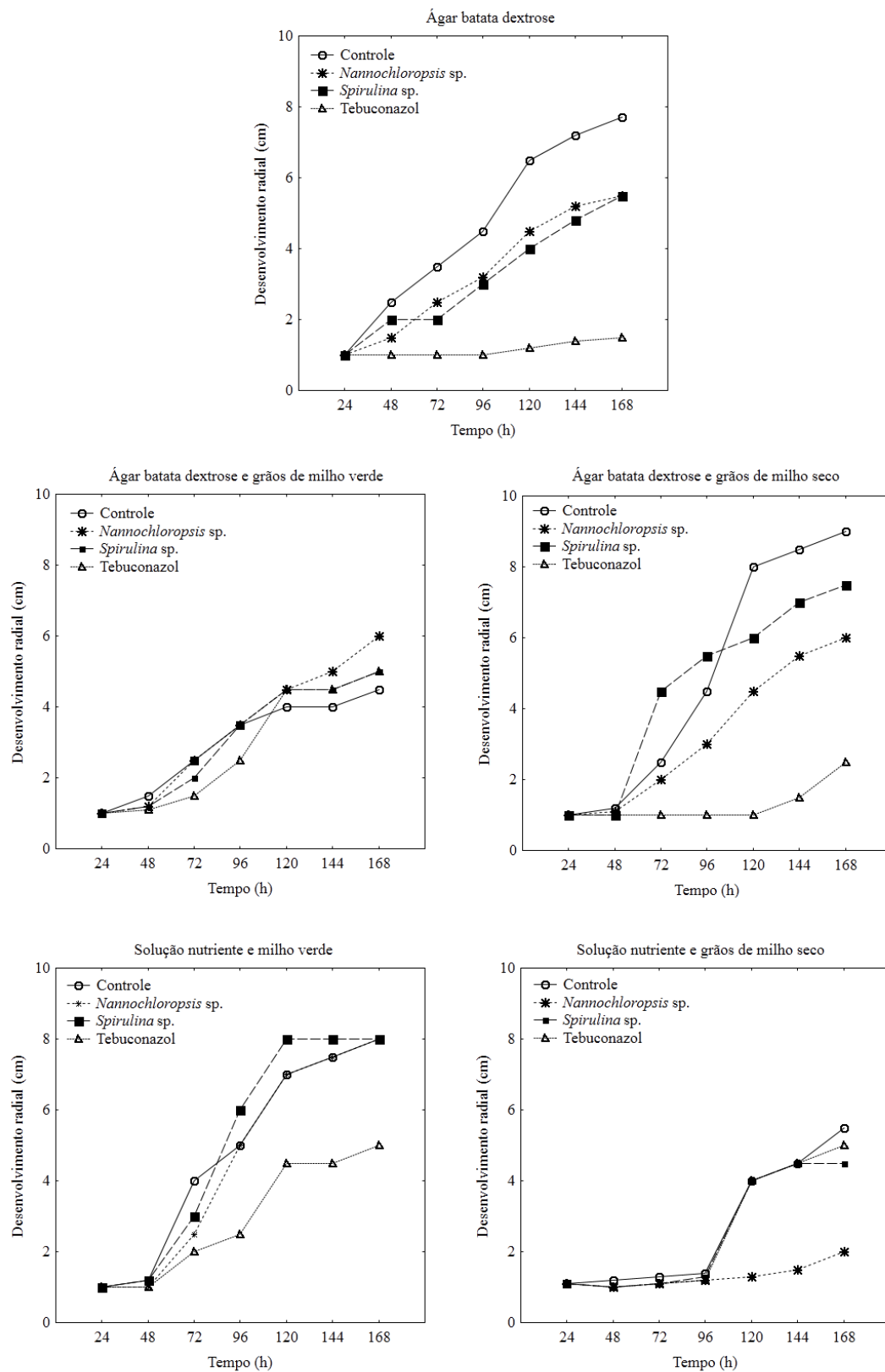
A análise de variância (ANOVA) foi aplicada aos resultados, seguida do teste de Tukey com nível de confiança de 90%, pelo software Statistica 10.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EFEITO DA APLICAÇÃO DOS EXTRATOS NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA PELO FUNGO

A Figura 2 mostra o desenvolvimento do halo fúngico quando submetido aos diferentes tratamentos. Na presença de ágar, o tebuconazol apresentou melhor efeito de inibição (81% após 168 h de incubação), enquanto que ambos os extratos de microalgas reduziram em 29% o desenvolvimento do halo ao final do período.

Figura 2 - Desenvolvimento radial dos discos de micélio da cepa de *Fusarium fujikuroi* submetida a diferentes tratamentos.



Os extratos fenólicos de microalgas não inibiram a produção de biomassa fúngica nos substratos milho verde, ágar e solução nutriente, no entanto o tebuconazol inibiu 38%. No milho seco, os extratos fenólicos naturais de *Nannochloropsis* sp. reduziram em 64% a biomassa e o mesmo reduziu 33% em solução nutriente. Enquanto que o extrato fenólico de *Spirulina* sp. inibiu para os mesmos meios 18 e 17%, respectivamente, o tebuconazol inibiu 72 e 9%.

Os resultados demonstraram que tanto os extratos de microalgas quanto o tebuconazol apresentam maior tendência a inibir o desenvolvimento do halo na presença de milho seco. Um fator importante que deve ser considerado é a umidade do meio de cultivo, tendo em vista que os grãos de milho seco apresentavam um teor de umidade médio de 6,6%, enquanto que o milho verde continha cerca de 57% de umidade, favorecendo desta forma o desenvolvimento da cepa de *Fusarium* (CHOI et al., 2015; RUPOLLO et al., 2006). Este comportamento sugere que a presença de água no meio dificulta a ação dos antifúngicos naturais e do sintético contra esta espécie de *Fusarium*. Será importante estudar uma nova formulação para aplicação destes princípios ativos.

3.2 EFEITO DOS EXTRATOS NATURAIS E FUNGICIDA COMERCIAL NA CONCENTRAÇÃO DE ERGOSTEROL E NA ATIVIDADE DA α -AMILASE

A determinação do ergosterol como indicativo da evolução da biomassa fúngica mostrou comportamento semelhante ao efeito no desenvolvimento radial (Tabela 3), visto que os extratos e o fungicida comercial apresentaram menor efeito no meio contendo ágar e milho verde. Porém, na presença de milho seco após 168 h de incubação os extratos fenólicos de *Nannochloropsis* sp. e *Spirulina* sp. e o tebuconazol foram capazes de inibir 77, 74 e 98% da produção de ergosterol, respectivamente.

Além disso, a presença de inibidores enzimáticos no grão de milho pode auxiliar na inibição da produção de ergosterol, que é uma biomolécula lipídica, tendo em vista que Figueira et al. (2003) verificaram a presença de inibidores protéicos com maior hidrofobicidade em grãos de milho, quando comparado com outros cereais (aveia e trigo).

O efeito dos extratos na redução da atividade da α -amilase também seguiu a tendência de ser mais pronunciado no milho seco, já que no milho verde apenas o extrato fenólico de *Nannochloropsis* sp. apresentou algum efeito redutor (15%) (Tabela 3).

Novamente sugerindo que neste micro-organismo a água afeta a capacidade inibidora dos princípios ativos.

Tabela 3 - Redução (%) da atividade enzimática da α -amilase e da concentração de ergosterol produzido em relação ao tratamento controle.

Meio de cultivo	<i>Nannochloropsis</i> sp.		<i>Spirulina</i> sp.		Tebuconazol	
	24 h	168 h	24 h	168 h	24 h	168 h
Redução (%) na concentração de ergosterol						
Ágar	ND	82	ND	84	ND	100
Ágar e milho verde	ND	13	ND	17	ND	17
Ágar e milho seco	100	77	57	74	100	98
Redução (%) na atividade de α -amilase						
Ágar	55	39	65	28	78	64
Ágar e milho verde	9	15	10	NI	16	NI
Ágar e milho seco	54	NI	13	66	30	32

*NI: não inibiu a atividade da enzima. ND: não detectado.

O efeito inibidor de α -amilase menos pronunciado no milho verde também pode ter sido consequência da elevada produção desta enzima pelo metabolismo do grão, tendo em vista que nesta fase ocorre rápida absorção de água pela semente e um grande aumento na sua atividade metabólica, aumentando a taxa de respiração e incrementando a divisão e o crescimento de células. Com o aproveitamento de aminoácidos e carboidratos solúveis, armazenados no embrião, ocorre crescimento em extensão e aumento da divisão celular. Grande quantidade de giberelina é secretada, difundindo-se para a camada de aleurona que circunda o endosperma, estimulando a síntese e a liberação de enzimas hidrolíticas, particularmente a α -amilase e proteases, as quais induzem a produção de açúcares (RITCHIE; HANWAY; BENSON, 2003).

A atividade enzimática específica da α -amilase foi determinada a fim de verificar a contribuição do composto ativo de interesse na sua atividade (Figura 3). Os resultados mostraram que considerando a concentração de princípio ativo utilizada, os extratos de microalgas são capazes de inibir a atividade da enzima de forma mais efetiva.

3.3 EFEITO DA APLICAÇÃO *in vitro* DE EXTRATOS DE MICROALGAS E FUNGICIDA COMERCIAL NA PRODUÇÃO DE FUMONISINA B₁

A aplicação dos extratos naturais e tebuconazol resultou em maiores níveis de inibição de FB₁ no meio contendo somente ágar, com valores de 95, 96 e 80% para os extratos de *Nannochloropsis* sp., de *Spirulina* sp. e tebuconazol, respectivamente (Tabela 4), fato que comprova que situações de estresse, como alterações no meio, promovem a manifestação do potencial toxigênico. Na presença de milho seco os extratos mantiveram a sua eficiência, reduzindo 95 e 94% da produção de FB₁ quando aplicados os extratos fenólicos de *Nannochloropsis* sp. e *Spirulina* sp., respectivamente. Enquanto que o tebuconazol reduziu 53% a concentração da micotoxina em relação ao tratamento controle. Na presença de milho verde nenhum tratamento diferiu estatisticamente do controle, apesar de terem ocorrido reduções médias de 47, 45, e 30% com o emprego dos extratos de *Nannochloropsis* sp., *Spirulina* sp. e tebuconazol, respectivamente.

Figura 3 - Atividade específica da α -amilase ($\%_{\text{inibição}} \text{ min}^{-1} \mu\text{g}_{\text{princípio ativo}}^{-1}$) nos diferentes tratamentos do cultivo *in vitro* da cepa de *Fusarium fujikuroi*.

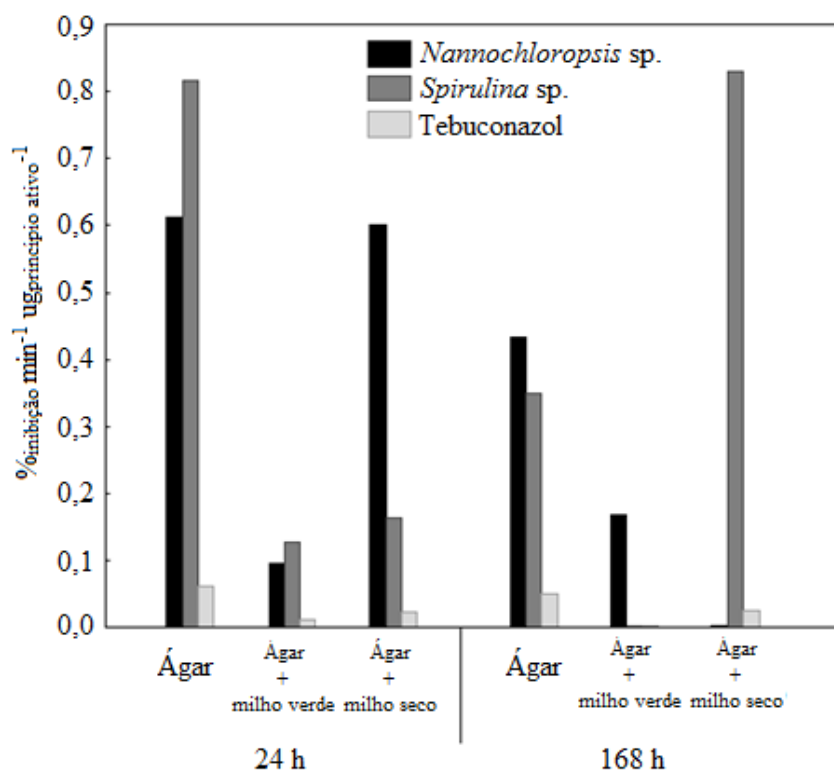


Tabela 4 - Concentração de fumonisina B₁ [$\mu\text{g kg}^{-1}$ (CV%)] produzida pela cepa de *Fusarium fujikuroi* submetida a diferentes tratamentos.

Meio de cultivo	Controle	<i>Nannochloropsis</i> sp.	<i>Spirulina</i> sp.	Tebuconazol
Ágar	926,4 (0,7) ^a	49,4 (4,1) ^c	41,7 (4,5) ^c	181,7 (18,1) ^b
Ágar e milho verde	152,0 (2,4) ^a	80,5 (27,4) ^a	110,4 (20,6) ^a	106,7 (2,4) ^a
Ágar e milho seco	1423,9 (15,5) ^a	71,9 (36,2) ^c	83,1 (15,1) ^c	670,0 (23,6) ^b

Letras diferentes na mesma linha indiciam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,10$).

3.4 APLICAÇÕES DOS EXTRATOS DE MICROALGAS EM CAMPO

A composição centesimal dos grãos de milho apresentou valores dentro da faixa esperada (AACC, 2003) e não variou significativamente em função dos diferentes tratamentos. Naqueles grãos provenientes do campo de Micoprincem, os teores foram: amido (71,5 a 73,6%); proteína (7,7 a 8,6%); lipídeos (4,6 a 5,1%); fibra (1,7 a 1,8%) e cinzas (1,5 a 1,6%). Enquanto que para os do campo de Cordero, foram: amido (69,7 a 71,3%); proteína (9,5 a 10,5%); lipídeos (4,6 a 5,4%); fibras (1,7 a 1,9%) e cinzas (1,7 a 1,8%).

No estudo *in vivo* no cultivo de milho também se buscou avaliar os parâmetros de campo que auxiliassem na explicação dos efeitos inibitórios dos extratos frente à produção de fumonisinas, bem como os parâmetros de produtividade dos grãos (Tabelas 5 e 6).

A grande variabilidade entre as réplicas dificultou a análise estatística, pois resultou, na grande maioria dos casos, em valores estatisticamente iguais ao tratamento controle.

O emprego de inseticida no campo de Micoprincem não influenciou nos parâmetros avaliados. No norte da Itália, os tratamentos com inseticidas são realizados com sucesso nas culturas de milho durante os estádios de maturação e as aplicações de fungicidas em misturas com inseticidas vêm controlando doenças foliares de forma mais eficiente durante a última parte da maturação, preservando o tecido da folha verde por mais tempo (BLANDINO et al., 2009, 2012). Causin et al. (2008), em experimentos de campo não inoculados com fungos, mostraram que a infestação da broca do colmo foi controlada através de aplicações de inseticidas e as proporções de várias misturas de princípios ativos de fungicidas foram aplicadas no florescimento do milho, promovendo a redução da contaminação por *F. verticillioides*. No entanto, Folcher et al. (2009) e Mazzoni et al. (2011) relataram que a adição de um fungicida (tebuconazol ou tebuconazol + prothioconazol) a um

tratamento inseticida no florescimento não reduz significativamente a concentração de fumonisina em grãos de milho em comparação com uma aplicação de inseticida sozinho.

Tabela 5 - Resultados dos tratamentos realizados na cultura de milho no campo de Micoprinçem.

Exp	Broca do colmo		Presença fúngica		Produtividade (T ha ⁻¹)	FB ₁ (µg kg ⁻¹)	% redução	FB ₂ (µg kg ⁻¹)	% redução
	Incidência (%)	Severidade	Incidência (%)	Severidade					
Cont	87 ^a	13,4 ^a	83 ^a	6,8 ^a	11,6 ^a	6943 ^a		2412 ^a	
Sp	97 ^a	17,9 ^a	93 ^a	6,8 ^a	12,9 ^a	1169 ^b	83	493 ^b	80
Na	90 ^a	18,4 ^a	90 ^a	10,4 ^a	13,5 ^a	3003 ^{ab}	57	1083 ^{ab}	55
Pr	88 ^a	14,7 ^a	77 ^a	7,7 ^a	11,1 ^a	2227 ^{ab}	68	732 ^{ab}	70
Cont	37 ^a	4,5 ^a	40 ^a	2,5 ^a	13,2 ^a	981 ^a		361 ^a	
Sp	31 ^a	2,4 ^a	31 ^a	1,0 ^a	12,5 ^a	66 ^b	93	64 ^b	82
Na	47 ^a	2,6 ^a	40 ^a	1,2 ^a	11,9 ^a	556 ^{ab}	43	232 ^{ab}	36
Pr	50 ^a	6,1 ^a	53 ^a	3,7 ^a	13,7 ^a	565 ^{ab}	42	208 ^{ab}	42
Cont	87 ^a	11,4 ^a	82 ^a	6,7 ^a	13,4 ^a	2328 ^a		767 ^a	
Sp	87 ^a	17,8 ^a	92 ^a	8,4 ^a	14,9 ^a	1558 ^a	33	594 ^a	22
Na	100 ^a	18,3 ^a	100 ^a	9,7 ^a	12,3 ^a	5326 ^a	-	2076 ^a	-
Pr	89 ^a	13,6 ^a	79 ^a	8,1 ^a	14,3 ^a	2793 ^a	-	887 ^a	-
Cont	40 ^a	4,6 ^a	40 ^a	2,1 ^a	13,2 ^a	740 ^a		318 ^a	
Sp	38 ^a	1,5 ^a	33 ^a	0,9 ^a	11,5 ^a	1397 ^a	-	516 ^a	-
Na	51 ^a	2,7 ^a	49 ^a	2,0 ^a	13,7 ^a	998 ^a	-	381 ^a	-
Pr	46 ^a	4,7 ^a	43 ^a	2,6 ^a	13,8 ^a	132 ^a	82	89 ^a	72

Letras diferentes entre as linhas (de 1 a 4; 5 a 8; 9 a 12; e 13 a 16, separadamente) indicam diferença significativa ($p < 0,10$). Experimentos: Contr: controle; Sp: extrato de *Spirulina* sp. (40,4 µg mL⁻¹); Na: extrato de *Nannochloropsis* sp. (45,2 µg mL⁻¹); Pr: prosaro (tebuconazol 200 g i. a. ha⁻¹ + protriocanazol 200 g i. a. ha⁻¹). De 1 a 4: florescimento sem inseticida; de 5 a 8: florescimento com inseticida; de 9 a 12 grão leitoso sem inseticida; de 13 a 16 grão leitoso com inseticida.

No presente estudo, as concentrações de FB₁ e FB₂ foram reduzidas por todos os tratamentos aplicados na fase de florescimento do grão. A aplicação na fase de grão leitoso não mostrou resultados satisfatórios, reforçando a importância do estabelecimento de um protocolo correto para aplicação, pois o *Fusarium* spp. apresenta baixa sensibilidade a determinados fungicidas (BRODERS et al., 2007; GUTIERREZ-CHAPIN et al., 2006). Cabe mencionar que não há efeito comprovado quanto ao controle da concentração de fumonisina quando fungicidas e inseticidas são pulverizados na fase de grão leitoso (BLANDINO et al., 2012).

Tabela 6 - Resultados dos tratamentos realizados na cultura de milho no campo de Cordero.

Exp	Broca do colmo		Presença fúngica		Produtividade (T ha ⁻¹)	FB ₁ (µg kg ⁻¹)	% redução	FB ₂ (µg kg ⁻¹)	% redução
	Incidência (%)	Severidade	Incidência (%)	Severidade					
Cont	33 ^a	1,6 ^a	56,7 ^a	4,0 ^a	17,5 ^a	2044 ^a		866 ^a	
Sp	40 ^a	2,1 ^a	86,7 ^a	7,9 ^a	17,0 ^a	4148 ^a	-	1608 ^a	-
Na	54 ^a	1,7 ^a	68,5 ^a	6,3 ^a	16,2 ^a	1269 ^a	38	441 ^a	49
Pr	40 ^a	1,5 ^a	70,0 ^a	6,8 ^a	17,0 ^a	3658 ^a	-	1234 ^a	-
Cont	17 ^c	0,8 ^b	70,0 ^a	4,7 ^a	14,8 ^a	1837 ^a		613 ^a	
Sp	60 ^a	3,0 ^{ab}	73,3 ^a	5,9 ^a	16,4 ^a	3118 ^a	-	1053 ^a	-
Na	47 ^{ab}	3,3 ^a	83,0 ^a	7,8 ^a	15,3 ^a	2705 ^a	-	952 ^a	-
Pr	24 ^{bc}	1,0 ^{ab}	65,2 ^a	3,7 ^a	15,2 ^a	2023 ^a	-	643 ^a	-
Cont	63 ^a	3,9 ^a	90,0 ^a	4,6 ^b	17,9 ^a	2562 ^a		1056 ^a	
Sp	25 ^a	1,5 ^a	62,5 ^a	8,2 ^a	16,0 ^a	1531 ^a	40	491 ^a	54
Na	43 ^a	3,1 ^a	86,7 ^a	7,2 ^{ab}	16,8 ^a	1067 ^a	58	410 ^a	61
Pr	43 ^a	2,2 ^a	68,9 ^a	4,5 ^{ab}	16,5 ^a	1869 ^a	27	503 ^a	52
Cont	43 ^a	3,0 ^a	76,7 ^a	5,8 ^a	16,9 ^a	2454 ^a		696 ^a	
Sp	41 ^a	3,8 ^a	67,3 ^a	5,3 ^a	15,7 ^a	1394 ^a	43	505 ^a	27
Na	43 ^a	2,3 ^a	66,7 ^a	6,9 ^a	15,8 ^a	1596 ^a	35	673 ^a	3
Pr	56 ^a	4,2 ^a	90,0 ^a	8,6 ^a	16,0 ^a	5035 ^a	-	1787 ^a	-

Letras diferentes entre as linhas (de 1 a 4; 5 a 8; 9 a 12; e 13 a 16, separadamente) indicam diferença significativa ($p < 0,10$). Experimentos: Contr: controle; Sp: extrato de *Spirulina* sp. (40,4 µg mL⁻¹); Na: extrato de *Nannochloropsis* sp. (45,2 µg mL⁻¹); Pr: prosaro (tebuconazol 200 g i. a. ha⁻¹ + proclonazol 200 g i. a. ha⁻¹). De 1 a 4: florescimento com aração; de 5 a 8: florescimento com cultivo mínimo; de 9 a 12 grão leitoso com aração; de 13 a 16 grão leitoso com cultivo mínimo.

Foi observada uma redução de até 93% na produção de FB₁, quando aplicado o extrato fenólico de *Spirulina* sp. com a presença de inseticida na fase de florescimento (Experimento 6), neste mesmo experimento, a concentração de FB₂ foi reduzida 82%. O extrato fenólico de *Nannochloropsis* sp. apresentou melhor efeito quando aplicado na ausência de inseticida, também na fase de florescimento (Experimento 3), inibindo 57 e 55% da produção de FB₁ e FB₂, respectivamente. De maneira geral, ambos os extratos naturais apresentaram efeito similar ao fungicida Prosaro. Apenas na fase de grão leitoso na presença de inseticida o fungicida teve um efeito de destaque perante aos extratos naturais.

De acordo com Hewitt (1998), os fungicidas podem ser classificados, quanto às subfases da infecção no qual atuam, em: preventivos (inibe a germinação impedindo a penetração do fungo nos tecidos do hospedeiro); curativos (ação pós infecção, quando ocorreu a penetração do tubo germinativo do fungo, mas ainda não são vistos sistomas); e erradicativos (ação inibitória do crescimento micelial dos oídios ou morte das estruturas dos

fungos que causem doenças comumente denominadas de ferrugens, não ocorre a regeneração ou recuperação de células ou tecidos mortos). A maioria dos fungicidas triazóis apresenta ação erradicante, ou seja, matam os patógenos, porém os tecidos injuriados, principalmente as folhas, não se regeneram. Neste estágio, a produção de micotoxinas pode ter ocorrido, fato que comprova que muitas vezes os fungicidas sintéticos não são capazes de inibir a produção destes compostos tóxicos.

3.5 CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS E ERGOSTEROL NOS GRÃOS DE MILHO PROVENIENTES DOS CAMPOS

Foi determinada a concentração de ácidos fenólicos, os mais prováveis responsáveis pela inibição fúngica (PAGNUSSATT et al., 2016; SOUZA et al., 2011) nos grãos de milho provenientes dos dois campos experimentais (Tabela 7). Estes apresentaram composição variada entre os nove ácidos avaliados, sendo representados majoritariamente pelo protocatecico, clorogênico e ferúlico. Não foi observada diferença significativa (somente considerando o efeito dos diferentes extratos de microalgas e fungicida comercial empregado) em nenhum caso. Variáveis abióticas e bióticas interferem no efeito inibidor dos compostos aplicados para prevenir pragas durante o cultivo, com consequente impacto na variabilidade dos resultados, o que promoveu não homogeneidade dos dados, dificultando a análise estatística paramétrica. De qualquer forma, as quantidades aplicadas não interferem no aporte fenólico dos grãos, conforme o esperado.

O teor de ergosterol também foi avaliado nos grãos provenientes dos diferentes tratamentos (Tabela 7) e foram verificadas concentrações variadas. Quando aplicado na fase de florescimento, o conteúdo de ergosterol nos grãos do campo tratados com o extrato fenólico de *Nannochloropsis* sp. diferiu do controle em todas as condições, enquanto que na fase de grão leitoso apenas no campo de Cordeiro este tratamento mostrou efeito significativo em relação ao controle. Os experimentos com o extrato fenólico de *Spirulina* sp. apresentaram redução significativa em Micoprince na ausência de inseticida, enquanto no campo de Cordeiro o melhor efeito ocorreu quando aplicou-se na fase de grão leitoso utilizando o cultivo mínimo como preparo do solo, estes comportamento foi semelhante ao conteúdo de fumonisinas encontrado nos diferentes tratamentos, e mostra a relação direta entre biomassa fúngica e produção de seus metabólitos tóxicos.

Tabela 7 - Concentração de ácidos fenólicos nos grãos de milho cultivados sob diferentes tratamentos.

Campo de Micoprinçem					Campo de Cordero				
Fase	Uso de inseticida	Tratamento	Ácidos fenólicos ($\mu\text{g g}^{-1}$) (CV%)	Ergosterol (ng g^{-1}) (CV%)	Fase	Manejo do solo	Tratamento	Ácidos fenólicos ($\mu\text{g g}^{-1}$) (CV%)	Ergosterol (ng g^{-1}) (CV%)
Florescimento	Não	Controle	83,4 (22) ^a	43,9 (4,2) ^a	Florescimento	Aração	Controle	64,2 (48) ^a	16,9 (9,7) ^{ab}
		<i>Spirulina</i> sp.	60,9 (32) ^a	30,4 (4,9) ^b			<i>Spirulina</i> sp.	88,0 (58) ^a	26,2 (3,6) ^a
		<i>Nannochloropsis</i>	60,9 (34) ^a	8,2 (4,0) ^d			<i>Nannochloropsis</i>	115,4 (28) ^a	10,1 (6,7) ^b
		Prosaro*	54,3 (15) ^a	17,5 (3,8) ^c			Prosaro*	154,8 (16) ^a	11,2 (13,3) ^b
	Sim	Controle	61,8 (20) ^a	6,4 (0,3) ^{bc}		Cultivo mínimo	Controle	154,5 (14) ^a	47,7 (4,5) ^a
		<i>Spirulina</i> sp.	37,0 (10) ^a	21,2 (3,5) ^a			<i>Spirulina</i> sp.	162,7 (11) ^a	ND*
		<i>Nannochloropsis</i>	47,3 (24) ^a	10,3 (10) ^b			<i>Nannochloropsis</i>	137,4 (13) ^a	27,6 (3,6) ^b
		Prosaro*	78,4 (23) ^a	0,7 (6,7) ^c			Prosaro*	134,3 (14) ^a	42,7 (7,7) ^a
Grão leitoso	Não	Controle	55,9 (10) ^a	22,4 (5,5) ^b	Grão leitoso	Aração	Controle	109,5 (39) ^a	34,7 (6,1) ^b
		<i>Spirulina</i> sp.	70,9 (50) ^a	20,6 (3,6) ^b			<i>Spirulina</i> sp.	119,0 (5) ^a	90,4 (8,2) ^a
		<i>Nannochloropsis</i>	62,3 (16) ^a	80,0 (2,6) ^a			<i>Nannochloropsis</i>	100,9 (30) ^a	21,5 (6,7) ^c
		Prosaro*	47,3 (28) ^a	9,3 (10) ^c			Prosaro*	99,8 (7) ^a	33,6 (5,6) ^b
	Sim	Controle	73,5 (15) ^a	12,2 (2,1) ^a		Cultivo mínimo	Controle	98,8 (5) ^a	53,3 (4,2) ^b
		<i>Spirulina</i> sp.	96,6 (36) ^a	17,3 (5,5) ^a			<i>Spirulina</i> sp.	92,7 (5) ^a	37,3 (2,5) ^c
		<i>Nannochloropsis</i>	86,2 (10) ^a	11,7 (4,5) ^a			<i>Nannochloropsis</i>	94,9 (21) ^a	37,0 (4,9) ^c
		Prosaro*	89,0 (41) ^a	8,8 (11,3) ^a			Prosaro*	96,7 (23) ^a	116,1 (3,4) ^a

Letras diferentes entre as linhas (de 1 a 4; 5 a 8; 9 a 12; e 13 a 16, separadamente) indicam diferença significativa ($p < 0,10$). *não detectado.

3.6 ESTIMATIVA DA DOSE RECOMENDADA

Considerando que no experimento *in vitro* foram utilizados 19 g de grãos de milho e que para a aplicação dos extratos no campo se borrifou 10 mL de extrato por planta de milho e que cada parcela continha 10 plantas com produtividade média de 300 g de grãos por espiga, foram estimadas as doses de princípio ativo utilizadas nos dois casos e as suas eficiências resultantes (Tabela 8).

Esta estimativa demonstra que é possível aumentar a eficiência nos experimentos em campo desde que se amplie a escala de produção de biomassa de microalgas, bem como estabelecer processos de recuperação do princípio ativo da biomassa para tornar viável a aplicação de fenólicos com poder antifúngico e antimicotoxigênico de fonte natural em escala de cultivo comercial.

Tabela 8 - Dados demonstrativos da eficiência da dose dos extratos fenólicos de microalgas aplicadas em experimentos *in vitro* e em campo.

Extrato	Experimento <i>in vitro</i>				Experimento em campo			
	Volume de extrato (mL)	Massa tratada (g)	Dose (mL g ⁻¹)	Eficiência média de inibição (%)*	Volume de extrato (mL)	Massa tratada (g)	Dose (mL g ⁻¹)	Eficiência média de inibição (%)*
<i>Nannochloropsis</i> sp. (45,2 µg mL ⁻¹)	2	19	0,11	79	100	3000	0,033	43,5
<i>Spirulina</i> sp. (40,0 µg mL ⁻¹)	2	19	0,11	78	100	3000	0,033	55,7

*valor estimado pela média de todas as reduções da concentração de micotoxinas encontrada para cada extrato.

4 CONCLUSÃO

Considerando a procedência natural dos compostos antifúngicos e a exposição deles aos fatores como luminosidade solar, variação de temperatura e ocorrência de ventos, os resultados obtidos são promissores e justificam o investimento de pesquisas para aumentar a sua eficiência em ambiente natural. Em experimentos *in vitro*, indicaram que o melhor momento de ação dos extratos ocorreu durante a formação do grão, com sua umidade reduzida. Os extratos fenólicos extraídos das microalgas *Nannochloropsis* sp. e *Spirulina* sp. apresentaram efeito inibidor da contaminação na cultura de milho por *Fusarium verticillioides*, além disso, inibiram a produção de FB₁ na ordem de 90%, e FB₂ em 82%.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC. **American Association of Cereal Chemists**. WATSON, S. A. Description, development, structure and composition of the corn lernel. In Corn: Chemistry and Technology, 2nd ed.; White, J. Johnson, L., Eds., St. Paul, MN, p. 69-101, 2003.

ALBONICO, M.; SCHUTZ, L. F.; CALONI, F.; CORTINOVIS, C.; SPICER, L. J. *In vitro* effects of the *Fusarium* mycotoxins fumonisin B₁ and beauvericin on bovine granulosa cell proliferation and steroid production. **Toxicon**, v. 128, p. 38-45, 2017.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; ŠTAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 83, p. 412-431, 2003.

BLANDINO, M.; SCARPINO, V.; VANARA, F.; SULYOK, M.; KRSKA, R.; REYNERI, A. The Role of the European Corn Borer (*Ostrinia Nubilalis*) on contamination of maize with

thirteen *Fusarium* mycotoxins. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 32, n. 4, p. 533-543, 2015.

BLANDINO, M.; GALEAZZI, M.; SAVOIA, W.; REYNERI, A. Timing of azoxystrobin + propiconazole application on maize to control northern corn leaf blight and maximize grain yield. **Field Crops Research**, v. 139, p. 20-29, 2012.

BLANDINO, M.; REYNERI, A.; VANARA, F.; PASCALE, M.; HAIDUKOWSKI, M.; CAMPAGNA, C. Management of fumonisin contamination in maize kernels through the timing of insecticide application against European corn borer. **Food Additives & Contaminants**, v. 26, p. 1501-1514, 2009.

BRODERS, K. D.; LIPPS, P. E.; PAUL, P. A.; DORRANCE, A. E. Evaluation of *Fusarium graminearum* associated with corn and soybean seed and seedling disease in Ohio. **Plant Disease Journal**, v. 91, p. 115-1160, 2007.

CAUSIN, R.; COSTA, E.; RASERA, R.; ROSSI, G.; SCOPEL, C. **Chemical treatments at silk stage reduce fumonisins contamination of maize kernels**. In: Proceedings of The World Mycotoxin Forum – The Fifth Conference, Noordwijk (NL), November 17–18, p. 124, 2008.

CHOI, S.; JUN, H.; BANG, J.; CHUNG, S. H.; KIM, Y.; KIM, B.; KIM, H.; BEUCHAT, L. R.; RYU, J. H. Behaviour of *Aspergillus flavus* and *Fusarium graminearum* on rice as affected by degree of milling, temperature, and relative humidity during storage. **Food Microbiology**, v. 46, p. 307-313, 2015.

DESMARCHELIER, J. M. O.; TELLA, P.; GREMAUD, W. S.; MOTTIER, P. Development and Comparison of Two Multiresidue Methods for the Analysis of 17 Mycotoxins in Cereals by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 7510-7519, 2010.

FERNÁNDEZ-BLANCO, C.; FRIZZELL, C.; SHANNON, M.; RUIZ, M. J.; CONNOLLY, L. An *in vitro* investigation on the cytotoxic and nuclear receptor transcriptional activity of the mycotoxins fumonisin B₁ and beauvericin. **Toxicology Letters**, v. 257, p. 1-10, 2016.

FIGUEIRA, E. L. Z.; BLANCO-LABRA, A.; GERAGE, A. C.; ONO, E. Y. S.; MENDIOLA-OLAYA, E.; UENO, Y.; HIROOKA, E. Y. New amylase inhibitor present in corn seeds active *in vitro* against amylase from *Fusarium verticillioides*. **Plant Disease**, v. 87, n.3, p. 233-240, 2003.

FOLCHER, L.; JARRY, M.; WEISSENBERGER, A.; GÉRAULT, F.; EYCHENNE, N.; DELOS, M.; REGNAULT-ROGER, C. Comparative activity of agrochemical treatments on mycotoxin levels with regard to corn borers and *Fusarium* mycoflora in maize (*Zea mays* L.) fields. **Crop Protect**, v. 28, p. 302-308, 2009.

GUO, B.; JI, X.; NI, X.; FOUNTAIN, J. C.; LI, H.; ABBAS, H. K.; LEE, R. D.; SCULLY, B. T. Evaluation of maize inbred lines for resistance to pre-harvest aflatoxin and fumonisin contamination in the field. **The Crop Journal**, in press, 2016.

GUTIERREZ-CHAPIN, L. J.; WANG, Y.; LUTTON, E.; MCSPADDEN-GARDENER, B. B. Distribution and fungicide sensitivity of fungal pathogens causing anthracnose-like lesions on tomatoes grown in Ohio. **Plant Disease Journal**, v. 90, p. 397-403, 2006.

HEWITT, H. G. **Fungicides in crop protection**. CAB International. Chapter 4. Fungicide Performance. 1998.

MAZZONI, E.; SCANDOLARA, A.; GIORNI, P.; PIETRI, A.; BATTILANI, P. Field control of *Fusarium* ear rot, *Ostrinia nubilalis* (Hübner), and fumonisin in maize kernels. **Pest Management Science**, v. 67, p. 458-465, 2011.

PAGNUSSATT, F. A.; DE LIMA, V. R.; DORA, C. L.; COSTA, J. A. V.; PUTAUX, J. L.; BADIALE-FURLONG, E. Assessment of the encapsulation effect of phenolic compounds from *Spirulina* sp. LEB-18 on their antifusarium activities. **Food Chemistry**, v. 211, p. 616-623, 2016.

PIRGOZLIEV, S. R.; EDWARDS, S. G.; HARE, M. C.; JENKINSON, P. Strategies for the control of fusarium head blight in cereals. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, p. 731-742, 2003.

RITCHIE, S. W.; HANWAY, J. J.; BENSON, G. O. **How a Corn Plant Develops**, Special Report no 48, Iowa State, University of Science and Technology, Ames, Iowa, 1993.

RUPOLLO, G.; GUTKOSKI, L. C.; MARTINS, I. R.; ELIAS, M. C. Effects of grain moisture and hermetic storage on fungi contamination and mycotoxin production in oats. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, n. 1, p. 118-125, 2006.

SALADINI, M.; BLANDINO, M.; REYNERI, A.; ALMA, A. The impact of insecticide treatments on *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae) and their influence on the mycotoxin contamination of maize kernels. **Pest Management Science**, v. 64, p. 1170-1178, 2008.

SOBEK, E. A.; MUNKVOLD, G. P. European Corn Borer (Lepidoptera: Pyralidae) Larvae as Vectors of *Fusarium moniliforme*, Causing Kernel Rot and Symptomless Infection of Maize Kernels. **Journal of Economic Entomology**, v. 92, p. 503-509. 1999.

SOUZA, M. M.; PRIETO, 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, p. 1050-1058, 2011.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÃO GERAL

Os extratos de ácidos fenólicos solúveis em metanol protegem contra a degradação hidrolítica e oxidativa, demonstrada pela redução da atividade das enzimas α -amilase e peroxidase, bem como de inativar os radicais livres ABTS e DPPH.

O valor da concentração eficaz mínima (EC_{50}) dos extratos fenólicos de microalgas para inibição das cepas pertencentes ao complexo de *F. graminearum* foi em torno de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$.

O ergosterol foi um bom indicativo da inibição da produção de biomassa de espécies de *Fusarium* pelos extratos de microalgas ($\rho = 0,92$).

A atividade antifúngica *in vitro* resultou em inibição média na produção dos tricotecenos (NIV, DON e ADONS) de 82 e 68% para os extratos de ácidos fenólicos de *Nannochloropsis* sp. e *Spirulina* sp., respectivamente.

Os extratos foram eficientes quando aplicados em cultivo de trigo em campo, mitigando a fusariose e a manifestação do potencial toxigênico. Na dose de 12 mL m^{-2} , o extrato de *Nannochloropsis* sp. inibiu em até 38% a produção de DON, enquanto que com o extrato de *Spirulina* sp. a inibição chegou a 55%.

In vitro os extratos de microalgas inibiram 95% da produção de fumonisina B_1 , enquanto que o tebuconazol inibiu 53%. Este experimento mostrou que o melhor momento de ação dos extratos ocorre quando o grão está formado.

No cultivo de milho em campo os extratos apresentaram maior capacidade antimicotoxigênica quando aplicados em conjunto com inseticida na fase de florescimento da planta, obtendo-se valores acima de 90% de inibição da produção de fumonisina B_1 e 82% para fumonisina B_2 .

CAPÍTULO V

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC. **American Association of Cereal Chemists**. WATSON, S. A. Description, development, structure and composition of the corn kernel. In *Corn: Chemistry and Technology*, 2nd ed.; White, J. Johnson, L., Eds., St. Paul, MN, p. 69-101, 2003.

ABDELLATEF, A. A.; KHALIL, A. A. Ameliorated effects of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 20076 and *Pediococcus acidilactici* NNRL B-5627 on Fumonisin B₁ induced Hepatotoxicity and Nephrotoxicity in rats. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.11, n. 2, p. 326-336, 2016.

ABIP – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PANIFICAÇÃO. **Produção de pão no Brasil**. Disponível em: <http://www.abip.org.br>. Acesso em: 31 de jan. 2017.

AHMED, F.; FANNING, K.; NETZEL, M.; TURNER, W.; LI, Y.; SCHENK, P. M. Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters. **Food Chemistry**, v. 165, p. 300-306, 2014.

ALBERTS, J. F.; GELDERBLOM, W. C. A.; THIEL, P. G.; MARASAS, W. F. O.; VAN SCHALKWYK, D. J.; BEHREND, Y. Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1729-1733, 1990.

ALBONICO, M.; SCHUTZ, L. F.; CALONI, F.; CORTINOVIS, C.; SPICER, L. J. *In vitro* effects of the *Fusarium* mycotoxins fumonisin B₁ and beauvericin on bovine granulosa cell proliferation and steroid production. **Toxicon**, v. 128, p. 38-45, 2017.

ALLCROFT, R.; CARNAGHAN, R. B. A. Groundnut toxicity *Aspergillus flavus* toxin (aflatoxin) in animal products. Preliminary Communication. **Journal of Veterinary Research**, v. 74, p. 863-864, 1962.

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.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; ŠTAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 83, p. 412-431, 2003.

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

AOKI, T.; WARD, T. J.; KISTLER, H. C.; O'DONNELL, K. Systematics, phylogeny and trichothecene mycotoxin potential of *Fusarium* head blight cereal pathogens. **Mycotoxins**, v. 62, n. 2, p. 91-102, 2012.

ASPÉ, E.; FERNÁNDEZ, K. The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus radita* Bark. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 838-844, 2011.

ASTOLFI, P. **Diversidade genética e potencial toxigênico de populações de *Fusarium graminearum* associadas ao trigo no sul do Brasil**. 2010. 98f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia com Ênfase em Fitopatologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

ATHIÉ, I.; CASTRO, M. F. P. M.; GOMES, R. A. R.; VALENTINI, S. R. T. **Conservação de grãos**. Campinas: Fundação Cargill, 236 p., 1998.

BADIALE-FURLONG, E.; VALENTE SOARES, L.; LASCA, C. C.; KOHARA, E. Y. Mycotoxin and fungi in wheat stored in elevators in State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 12, n. 5, p. 683-688, 1995.

BANSKOTA, A. H.; STEFANOVA, R.; GALLANT, P.; MCGINN, P. J. Mono- and digalactosyldiacylglycerols: potent nitric oxide inhibitors from the marine microalga *Nannochloropsis granulate*. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, p. 349-357, 2012.

BARAJ, E.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Influence of the trichothecenes DON and T-2 toxin in malt aminolytic enzymes activity. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.53, p. 14, 2010.

BASKARAN, R.; PULLENCHERI, D.; SOMASUNDARAM, R. Characterization of free, esterified and bound phenolics in custard apple (*Annona squamosa* L) fruit pulp by UPLC-ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 82, p. 121-127, 2016.

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

BEMVENUTI, R. H. **Inibição de linhagens do complexo *Fusarium graminearum* por compostos naturais e sintéticos**. 2014. 176f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

BERRUETA, L. A.; ALONSO-SALCES, R. M.; HEBERGER, K. Supervised pattern recognition in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 196-214. 2007.

BHOYAR, M. S.; MISHRA, G. P.; NAIK, P. K.; SRIVASTAVA, R. B. Estimation of antioxidant activity and total phenolics among natural populations of Caper (*Capparis spinosa*) leaves collected from cold arid desert of trans-Himalayas. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, p. 912-919, 2011.

BIERHALS, V. S.; MACHADO, V.; ECHEVENGUA, W.; COSTA, J. A. V.; FURLONG, E. B. Compostos fenolicos totais, atividade antioxidante e antifúngica de multimisturas enriquecidas com a microalga *Spirulina platensis*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 68, p. 42-48, 2009.

BLANDINO, M.; REYNERI, A.; VANARA, F.; PASCALE, M.; HAIDUKOWSKI, M.; SAPORITI, M. Effect of sowing date and insecticide application against European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) on fumonisin contamination in maize kernels. **Crop Protection**, v. 27, p. 1432-1436, 2008.

BLANDINO, M.; SCARPINO, V.; VANARA, F.; SULYOK, M.; KRSKA, R.; REYNERI, A. The Role of the European Corn Borer (*Ostrinia Nubilalis*) on contamination of maize with thirteen *Fusarium* mycotoxins. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 32, n. 4, p. 533-543, 2015.

BLANDINO, M.; GALEAZZI, M.; SAVOIA, W.; REYNERI, A. Timing of azoxystrobin + propiconazole application on maize to control northern corn leaf blight and maximize grain yield. **Field Crops Research**, v. 139, p. 20-29, 2012.

BLANDINO, M.; HAIDUKOWSKI, M.; PASCALE, M.; PLIZZARI, L.; SCUDELLARI, D.; REYNERI, A. Integrated strategies for the control of *Fusarium* head blight and deoxinivalenol contamination in winter wheat. **Field Crops Research**, v. 133, p. 139-149, 2012.

BLANDINO, M.; REYNERI, A.; VANARA, F.; PASCALE, M.; HAIDUKOWSKI, M.; CAMPAGNA, C. Management of fumonisin contamination in maize kernels through the timing of insecticide application against European corn borer. **Food Additives & Contaminants**, v. 26, p. 1501-1514, 2009.

BORGES, L. do V. **Caracterização do potencial de absorção do dióxido de carbono atmosférico por microalgas utilizadas na aquicultura para geração de um mecanismo de desenvolvimento limpo (MDL)**. 2005. 57 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2005.

BORGES, L.; FARIA, B. M.; ODEBRECHT, C.; ABREU, P. C. Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: primeiros passos para o desenvolvimento de um “Mecanismo de desenvolvimento limpo”. **Atlântica**, v. 29, p. 35-46, 2007.

BORGES, L.; MORÓN-VILLARREYES, J. A.; D’OCA, M. G. M.; ABREU, P. C. Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 4449-4454, 2011.

BOTTALICO, A. *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. **Journal of Plant Pathology**, v. 80, n. 2, p. 85-103, 1998.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução (ANVISA). Resolução n. 138, de 8 de fevereiro de 2017. Limites Máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de junho de 2003.

BRODERS, K. D.; LIPPS, P. E.; PAUL, P. A.; DORRANCE, A. E. Evaluation of *Fusarium graminearum* associated with corn and soybean seed and seedling disease in Ohio. **Plant Disease Journal**, v. 91, p. 115-1160, 2007.

BROWN, M. R. Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. Avances en nutrición acuícola. In: VI. MEMORIAS DEL VI SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 2002, Cancún, **Anais...** Cancún: Quintana Roo, 2002.

BRYDEN, W. L. Mycotoxins in the food chain: human health implications. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 16, n. 1, p. 95-101, 2007.

CAMPOS, V. B.; BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. O. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2, p. 339-347, 2010.

CARDINALI, A. T. N.; LIGORIO, A.; GIUFFRIDA, M. G.; NAPOLITANO, L.; CALIANDRO, R.; SERGIO, L.; VENERE, D. D.; LATTANZIO, V.; SONNANTE, G. Purification, biochemical characterization and cloning of a new cationic peroxidase isoenzyme from artichoke. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, p. 395-403, 2011.

CAS. **Chemical Abstracts Service**. Disponível em <http://www.cas.org/content/chemical-substances/>. Acessado em: 10 de fev 2017.

CAUSIN, R.; COSTA, E.; RASERA, R.; ROSSI, G.; SCOPEL, C. **Chemical treatments at silk stage reduce fumonisins contamination of maize kernels**. In: Proceedings of The World Mycotoxin Forum – The Fifth Conference, Noordwijk (NL), November 17–18, p. 124, 2008.

CETIN, Y.; BULLERMAN, L. B. Cytotoxicity of *Fusarium* mycotoxins to mammalian cell cultures as determined by the MTT bioassay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 755–764, 2005.

CHAMPEIL, A.; DORE, T.; FOURBET, J. F. *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. **Plant Science**, v. 166, p. 1389-1415, 2004.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biomass**, v. 25, p. 294-306, 2007.

CHOI, S.; JUN, H.; BANG, J.; CHUNG, S. H.; KIM, Y.; KIM, B.; KIM, H.; BEUCHAT, L. R.; RYU, J. H. Behaviour of *Aspergillus flavus* and *Fusarium graminearum* on rice as affected by degree of milling, temperature, and relative humidity during storage. **Food Microbiology**, v. 46, p. 307-313, 2015.

CHRIST-RIBEIRO, A.; BRETANHA, C. C.; GIACOBBO, G.; DE SOUZA, M. M.; BADIALE-FURLONG, E. Compostos fenólicos extraídos de fontes naturais aplicados como conservadores em massas de pizza. **Revista de Ciência e Inovação**, v. 1, n. 1, 2016.

CIPOLATTI, E. P.; BULSING, B. A.; SÁ, C. S.; BURKERT, C. A. V.; BADIALE-FURLONG, E.; BURKERT, J. F. M. Carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: Antioxidant activity and stability of extracts. **Africal Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 23, p. 1982-1988, 2015.

CIRILLO, T.; RITIENI, A.; GALVANO, F. E.; COCCHIERI, R. A. Natural co-occurrence of deoxynivalenol and fumonisins B₁ and B₂ in Italian marketed foodstuffs. **Food Additives and Contaminants**, v. 20, n. 6, p. 566-571, 2003.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; REICHERT, C.; COSTA, J. A. V. Production of biomass, lipids, phenolic compounds and proteins by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1489-1493, 2007.

CUSTÓDIO, L.; JUSTO, T.; SILVESTRE, L.; BARRADAS, A.; DUARTE, C. V.; PEREIRA, H.; BARREIRA, L.; RAUTER, A. P.; ALBERÍCIO, F.; VARELA, J. Microalgae of different phyla display antioxidant, metal chelating and acetylcholinesterase inhibitory activities. **Food Control**, v. 131, p. 134-140, 2012.

DALCERO, A.; TORRES, A.; ETCHEVERRY, M.; CHULZE, S.; VARSAVSKY, E. Occurrence of deoxynivalenol and *Fusarium graminearum* in Argentina wheat. **Food Additives and Contaminants**, v. 14, n. 1, p. 11-14, 1997.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**, Artmed, Porto Alegre, Brasil, 2010.

DANYAL, A.; MUBEEN, U.; MALIK, K. A. Investigating two native algal species to determine antibiotic susceptibility against some pathogens. **Current Research Journal of Biological Science**, v. 5, p. 70-74, 2013.

DEL PONTE, E. M.; FERNANDES, J. M. C.; PIEROBOM, C. R.; BERGSTROM, G. C. Giberela do Trigo - Aspectos Epidemiológicos e Modelos de Previsão. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 6, p. 587-605, 2004.

DEL PONTE, E.; SPOLTI, P.; WARD, T.; GOMES, L. B.; NICOLLI, C. P.; KUHNEM, P. R.; DA SILVA, C. N.; TESSMANN, D. J. Regional and field-specific factors affect the composition of *Fusarium* head blight pathogens in subtropical no-till wheat agroecosystem of Brazil. **Phytopathology**, v. 105, p. 246-254, 2015.

DESJARDINS, A.; HOHN, T. M.; MCCORMICK, S. P. Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. **Microbiological Reviews**, v. 57, n. 3, p. 595-604, 1993.

DESJARDINS, A. E. ***Fusarium* mycotoxins, chemistry, genetics, and biology**, American Phytopathological Society APS Press, St. Paul Minnesota, USA, 2006.

DESMARCHELIER, J. M. O.; TELLA, P.; GREMAUD, W. S.; MOTTIER, P. Development and Comparison of Two Multiresidue Methods for the Analysis of 17 Mycotoxins in Cereals by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 7510-7519, 2010.

DEVAIAH, S. P.; SHETTY, H. S. Purification of an infection-related acidic peroxidase from pearl millet seedlings. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 94, p. 119-126, 2009.

DIAZ, G. J.; BOERMANS, H. J. Fumonisins toxicoses em domestic animals: a review. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 36, n. 6, p. 548-555, 1994.

DILKIN, P.; ZORZETE, P.; MALLMANN, C. A.; GOMES, J. D.; UTIYAMA, C. E.; OETTING, L. L.; CORREA, B. Toxicological effects of chronic low doses of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁-containing *Fusarium moniliforme* culture material in weaned piglets. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 41, p. 1345-1353, 2003.

DIMMOCK, J. P. R. E.; GOODING, M. J. The effect of fungicides on rate and duration of grain filling in winter wheat in relation to maintenance of flag leaf green area. **Journal of Agricultural Science**, v. 138, p. 1-16, 2002.

DORS, G. C.; PRIMEL, E. G.; FAGUNDES C. A.; MARIOT, C. H. P.; BADIALE-FURLONG E. Distribution of pesticides in rice grain and rice bran. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 1921-1930, 2011.

DOYLE, M. E. ***Fusarium* mycotoxins**. Food Research Institute. Madison: University of Wisconsin, 1997.

EC. **European Commission**. Guidance Document on Residue Analytical Methods, SANCO/825/00, 2000.

EHLING, G.; COCKBURN, A.; SNOWDON, P.; BUCHHAUS, H. The significance of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol (DON) for human and animal health. **Cereal Research Communications**, v. 146, n. 6, p. 443-447, 1998.

EKBATAN, S. S.; SLENO, L.; SABALLY, K.; KHAIRALLAH, J.; BEHNAM, A.; RODES, L.; PRAKASH, S.; DONNELLY, D. J.; KUBOW, S. Biotransformation of polyphenols in a dynamic multistage gastrointestinal model. **Food Chemistry**, v. 204, p. 453-462, 2016.

EL-HOSSARY, E. M.; CHENG, C.; HAMED, M. M.; HAMED, A. N. E.; OHLSEN, K.; HENTSCHEL, U.; ABDELMOHSEN, U. R. Antifungal potential of marine natural products. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.126, 631-651, 2017.

EL-KASSAS, H.Y.; EL-SHEEKH, M. M. Cytotoxic activity of biosynthesized gold nanoparticles with an extract of the red seaweed *Corallina officinalis* on the MCF-7 human breast cancer cell line. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 10, p. 4311-4317, 2014.

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.

ESQUIVEL-HERNÁNDEZ, D. A.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, J.; ROSTRO-ALANIS, M.; CUÉLLAR-BERMÚDEZ, S. P.; MARCERA-ANDRADE, E. I.; NÚÑEZ-ECHEVARRÍA, J. E.; GARCÍA-PÉREZ, J. S.; CHANDRA, R.; PARRA-SALDÍVAR, R. Advancement of green process through microwave-assisted extraction of bioactive metabolites from *Arthrospira Platensis* and bioactivity evaluation. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 618-629, 2017.

FADDA, A.; SERRA, M.; MOLINU, M. G.; AZARA, E.; BARBERIS, A.; SANNA, D. Reaction time and DPPH concentration influence antioxidant activity and kinetic parameters

of bioactive molecules and plant extracts in the reaction with the DPPH radical. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 35, p. 112-119, 2014.

FANCELLI, A. L. Tecnologia da produção. In: FANCELLI, A. L.; LIMA, U. A. **Milho: produção, processamento e transformação industrial**. São Paulo: Secretaria da Indústria e Comércio, Ciência e Tecnologia, p. 1-68, 1983.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. FAO Statistical Yearbook 2016. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/018/i3107.htm>. Acesso em: 31 de jan 2017.

FAO/WHO. **Food and Agriculture Organization/Worlds Health Organization** (2001). Fifty-sixth meeting, Geneva, Summary and conclusions. Disponível em: <http://www.who.int/pcs/jecfa/summary56.pdf>. Acesso em: 05 de fev 2017.

FARVIN, K. H. S.; JACOBSEN, C. Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. **Food Chemistry**, v. 138, p. 1670-1681, 2013.

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

FERNÁNDEZ-BLANCO, C.; FRIZZELL, C.; SHANNON, M.; RUIZ, M. J.; CONNOLLY, L. An *in vitro* investigation on the cytotoxic and nuclear receptor transcriptional activity of the mycotoxins fumonisin B₁ and beauvericin. **Toxicology Letters**, v. 257, p. 1-10, 2016.

FERNANDEZ-FIGARES, I. ; MARINETTO, J. ; ROYO, C. ; RAMOS, J. M.; GARCIA DEL MORAL, L. F. Amino-acid composition and protein and carbohydrate accumulation in the grain of triticale grown under terminal water stress simulated by a senescing agent. **Journal of Cereal Science**, v. 32, p. 249-258, 2000.

FERNANDEZ-PINTO, V. E.; TERMMINIELLO, V. C.; BASILICO, J. C.; RITIENI, A. Natural occurrence of nivalenol and mycotoxigenic potential of *Fusarium graminearum* strains in wheat affected by head blight in Argentina. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 157-162, 2008.

FERRY, N.; EDWARDS, M. G.; GATEHOUSE, J. A.; GATEHOUSE, A. M. R. Plant insect interactions: molecular approaches to insect resistance. **Current Opinion and Biotechnology**, v. 15, p. 155-161, 2004.

FIGUEIRA, E. L. Z.; BLANCO-LABRA, A.; GERAGE, A. C.; ONO, E. Y. S.; MENDIOLA-OLAYA, E.; UENO, Y.; HIROOKA, E. Y. New amylase inhibitor present in corn seeds active *in vitro* against amylase from *Fusarium verticillioides*. **Plant Disease**, v. 87, n.3, p. 233-240, 2003.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE-STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

FOLCHER, L.; JARRY, M.; WEISSENBERGER, A.; GÉRAULT, F.; EYCHENNE, N.; DELOS, M.; REGNAULT-ROGER, C. Comparative activity of agrochemical treatments on mycotoxin levels with regard to corn borers and *Fusarium* mycoflora in maize (*Zea mays* L.) fields. **Crop Protect**, v. 28, p. 302-308, 2009.

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.

FORRER, H. R.; MUSA, T.; SCHWAB, F.; JENNY, E.; BUCHELI, T. D.; WETTSTEIN, F. E.; VOGELGSANG, S. *Fusarium* head blight control and prevention of mycotoxin in wheat with botanicals and tannic acid. **Toxins**, v. 6, p. 830-849, 2014.

FRANCO, O. L.; RIGDEN, D. J.; MELO, F. R.; BLOCH, J. R. C.; SILVA, C. P.; GROSSI-DESÁ, M. F. Activity of wheat α -amylase inhibitors towards bruchid α -amylases and structural explanation of observed specificities. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 2166-2173, 2000.

FREITAS, R. F.; SCHRACK, E. C.; HE, Q.; SILLIMAN, B. R.; FURLONG, E. B.; TELLES, A. C.; COSTA, C. S. B. Consumer control of the establishment of marsh foundation plants in intertidal mudflats. **Marine Ecology Progress Series**, v. 547, p. 79-89, 2016.

GAMANYA, R.; SIBANDA, L. Survey of *Fusarium moniliforme* (*F. verticillioides*) and production of fumonisin B₁ in cereal grains and oilseeds in Zimbabwe. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 145-149, 2001.

GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Kinetics deoxynivalenol degradation by *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae* in submerged fermentation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 710-714, 2010.

GARDA-BUFFON, J.; BARAJ, E.; BADIALE-FURLONG, E. Effect of deoxynivalenol and T-2 toxin in malt amylase activity. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 505-511, 2010.

GOH, L. P.; LOH, S. P.; FATIMAH, M. Y.; PERUMAL, K. Bioaccessibility of carotenoids and tocopherols in marine microalgae, *Nannochloropsis* sp. and *Chaetoceros* sp. **Malaysian Journal of Nutrition**, v. 15, n. 1, p. 77-86, 2009.

GOMES, L. B.; WARD, T. J.; FURLONG, E. B.; DEL PONTE, E. M. Species composition, toxigenic potential and pathogenicity of *Fusarium graminearum* species complex isolates from southern Brazilian rice. **Plant Pathology Journal** (Print), v. 64, p. 980-987, 2015.

GOSWAMI, R. S.; KISTLER, H. C. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. **Molecular Plant Pathology**, v. 5, p. 515-525, 2004.

GRANADO-LORENCIO, F.; OLMEDILLA-ALONSO, B.; HERRERO-BARBUDO, C.; BLANCO-NAVARRO, I.; PÉREZ-SACRISTAÑ, B.; BLÁZQUEZ-GARCÍA, S. *In vitro* bioaccessibility of carotenoids and tocopherols from fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 102, p. 641-648, 2007.

GRUZ, J.; NOVÁK, O.; STRNAD, M. Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 111, p. 789-894, 2008.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. L.; CHANLEY, M. H. (eds) **Culture of Marine Invertebrate Animals**, Plenum, New York, p. 29-60, 1975.

GUO, B.; JI, X.; NI, X.; FOUNTAIN, J. C.; LI, H.; ABBAS, H. K.; LEE, R. D.; SCULLY, B. T. Evaluation of maize inbred lines for resistance to pre-harvest aflatoxin and fumonisin contamination in the field. **The Crop Journal**, in press, 2016.

GUSCHINA, I.A.; HARWOOD, J.L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. **Progress in Lipid Research**, v.45(2), p.160-186, 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.

GUTIERREZ-CHAPIN, L. J.; WANG, Y.; LUTTON, E.; MCSPADDEN-GARDENER, B. B. Distribution and fungicide sensitivity of fungal pathogens causing anthracnose-like lesions on tomatoes grown in Ohio. **Plant Disease Journal**, v. 90, p. 397-403, 2006.

HAJIMAHMOODI, M.; ALI, 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.

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

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; TRALAMAZZA, S. M.; FERREIRA, C. F. J.; CORRÊA, B.; BADIALE-FURLONG, E. Effect of natural compounds on *Fusarium graminearum* complex. **Journal of the Science of Food Agriculture**, v. 96, n. 12, p. 3998-4008, 2016.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; HACKBART, H. C. S.; SOUZA, M. M.; DORS, G. C.; FAGUNDES, C. A.; BADIALE-FURLONG, E. Determinação de deoxinivalenol e zearalenona em arroz natural e parboilizado e suas frações utilizando QuEChERS e HPLC/UV-FL. **Química Nova**, v. 35, p.1-6, 2012.

HENNEQUIN, C.; ABACHIN, E.; SYMOENS, F.; LAVARDE, V.; REBOUX, G.; NOLARD, N.; BERCHE, P. Identification of *Fusarium* species involved in human infections by 28S rRNA gene sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 11, p. 3586-3589, 1999.

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.

HEWITT, H. G. **Fungicides in crop protection**. CAB International. Chapter 4. Fungicide Performance. 1998.

HORBERG, H. M. Patterns of splash dispersed conidia of *Fusarium poae* and *Fusarium culmorum*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 73-80, 2002.

HOSENEY, R.C. **Principio de ciencia e tecnologia de los cereales**. Zaragoza: Acribia. 1991.

HUSSEIN, A. I.; ANWAR, F.; NIGAM, P. S.; SARKER, S. D.; MOORE, J. E.; RAO, J. R.; MAZUMDAR, A. Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, p. 1199-1206, 2001.

IUPAC. **International Union of Pure and Applied Chemistry**. Guidelines for calibration in analytical chemistry. *Pure & Applied Chemistry*, v. 70, n.4, p. 993-1014, 1998.

JANSEN, C.; WETTSTEIN, D. V.; SCHÄFER, W.; KOGEL, K. H.; FELK, A.; MAIER, F. J. Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 46, p. 16892-16897, 2005.

JIA, Z.; DUMONT, M. J.; ORSAT, V. Encapsulation of phenolic compounds present in plants using protein matrices. **Food Bioscience**, v. 15, p. 87-104, 2016.

JORDAN, C. F. Derivation of leaf area index from quality of light on the forest floor. **Ecology**, v. 50, p. 663-666, 1969.

KARADENIZ, A.; CEMEK, M.; SIMSEK, N. The effects of *Panax ginseng* and *Spirulina platensis* on hepatotoxicity induced by cadmium in rats. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 231-235, 2009.

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

KHOZIN-GOLDBERG, I.; SHRESTHA, P.; COHEN, Z. Mobilization of arachidonyl moieties from triacylglycerols into chloroplastic lipids following recovery from nitrogen starvation of the microalga *Parietochloris incisa*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1738(1e3), p. 63-71, 2005.

KIM, E. K.; SCOTT, P. M.; LAU, B. P.Y. Hidden fumonisin in corn-flakes. **Food Additives and Contaminants**, v. 20, p. 161-169, 2003.

KLEJDUS, B.; KOPECKÝ, J.; BENESOVÁ, L.; VACEK, 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, n.5, p. 763-771, 2009.

KONIETZNY, U.; GREINER, R. The application of PCR in the detection of mycotoxigenic fungi in foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 283-300, 2003.

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.

KVAS, M.; MARASAS, W. F. O.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J.; STEENKAMP, E. T. Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. **Fungal Diversity**, v. 34, p. 1-21, 2009.

LEAL, P. C.; CANTANHEDE, K. L.; SILVA, L. M.; BEZERRA, G. F. B.; VIANA, G. M. C.; NASCIMENTO, M. D. S. B. Micotoxinas do *Fusarium* e seu potencial carcinogênico. **Revista Newslab**, ed. 70, p. 76-88, 2005.

LESLIE, J.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* Laboratory Manual**. Iowa: Blackwell Publishing, 387p, 2006.

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.

LI, R.; TAO, B.; PANG, M.; LIU, Y.; DONG, J. Natural occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in maize from three main maize-producing provinces in China. **Food Control**, v. 50, p. 838-842, 2015.

LIYANA-PATHIRANA, C.; SHAHIDI, F. Important of insoluble-bound phenolics to antioxidant properties of wheat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 1256-1264, 2006.

LOURENÇO, S. de O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. Brasil: RiMa, 2006.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, M. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MAADANE, A.; MERGHOUB, N.; AINANE, T.; ARROUSSI, H.; BENHIMA, R.; AMZAZI, S.; BAKRI, Y.; WAHBY, I. Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: Pufa profiles, carotenoids and phenolic content. **Journal of Biotechnology**, v. 215, p. 13-19, 2015.

MADONNA, A. J.; VOORHEES, K. J.; HADFIELD, T. L. Rapid detection of taxonomically important fatty acid methyl ester and steroid biomarkers using in situ thermal hydrolysis/methylation mass spectrometry (THM-MS): implications for bioaerosol detection. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 61, p. 65-89, 2001.

MAIORANO, A.; BLANDINO, M.; REYNERI, A.; VANARA, F. Effects of maize residues on the *Fusarium* spp. infection and deoxynivalonol (DON) contamination of wheat grain. **Crop Protection**, v. 27, p. 182-188, 2008.

MANGELSDORF, P. C. **Corn: Its Origin, Evolution, and Improvement**. Massachusetts: Harvard University Press, 262p., 1974.

MARÍN, P.; ORY, A.; CRUZ, A.; MAGAN, N.; GONZÁLEZ-JAÉN, M. T. Potential effects of environmental conditions on the efficiency of the antifungal tebuconazole controlling *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* growth rate and fumonisina biosynthesis. **International Journal of Food Microbiology**, v.165, n. 3, p. 251-258, 2013.

MARINOVA, E. M.; TONEVA, A.; YANISHLIEVA, N. Comparison of the antioxidative properties of caffeic and chlorogenic acids. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1498-1502, 2009.

MATEO, E. M.; VALLE-ALGARRA, F. M.; MATEO, R.; JIMÉNEZ, M.; MAGAN, N. Effect of fenpropimorph, prochloraz and tebuconazole on growth and production of T-2 and HT-2 toxins by *Fusarium langsethiae* in oat-based medium. **International Journal of Food Microbiology**, v.151, n. 3, p. 289-298, 2011.

MÁTUS-CÁDIZ, M. A.; HUCL, P.; PERRON, C. E.; TYLER, R. T. Genotype X environment interaction for grain color in hard white spring wheat. **Crop Science**, v. 43, p. 219-226, 2003.

MAZZONI, E.; SCANDOLARA, A.; GIORNI, P.; PIETRI, A.; BATTILANI, P. Field control of *Fusarium* ear rot. *Ostrinia nubilalis* (Hübner), and fumonisin in maize kernels. **Pest Management Science**, v. 67, p. 458-465, 2011.

MCMULLEN, M.; JONES, R.; GALLENBERG, D. Scab of wheat and barley: a re emerging disease of devastating impact. **Plant Disease**, v. 81, n. 12, p. 1340-1348, 1997.

MENDES, G. L.; PAGNUSSATT, F. A.; BRETANHA, C. C.; BADIALE-FURLONG, E. α -amylase inhibitors from wheat against development and toxigenic potential of *Fusarium verticillioides*. **Cereal Chemistry**, v. 92, p. 611-616, 2015.

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

MILLAO, S.; UQUICHE, E. Antioxidant activity of supercritical extracts from *Nannochloropsis gaditana*: Correlation with its content of carotenoids and tocopherols. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 111, p. 143-150, 2016.

MILLER, J. D.; SAVARD, M. E.; SCHAAFSMA, A. W.; SEIFERT, K. A.; REID, L. M. Mycotoxin production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* from Ontario and occurrence of fumonisin in the 1993 corn crop. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 17, p. 233-239, 1995.

MIN, B.; GU, L.; MCCLUNG, A. M.; BERGMAN, C. J.; CHEN, M. H. Free and bound total phenolic concentrations, antioxidant capacities, and profiles of proanthocyanidins and anthocyanins in whole grain rice (*Oryza sativa*, L.) of different bran colours. **Food Chemistry**, v. 133, p. 715-722, 2012.

MOKRANI, A.; MADANI, K. Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. **Separation and Purification Technology**, v. 162, p. 68-76, 2016.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. **Energy Conversion and Management**, v. 48, p. 2169-2173, 2007.

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.

MUGRABI- DE- KUPPLER, A. L.; STEINER, U.; SULYOK, M.; KRSKA, R.; OERKE, E. C. Genotyping and phenotyping of *Fusarium graminearum* isolates from Germany related to their mycotoxin biosynthesis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, p. 78-86, 2011.

MUNKVOLD, G. P.; DESJARDINS, A. E. Fumonisin in maize. Can we reduce their occurrence? **Plant Disease**, v.81, n.6, p.556-565, 1997.

MUNKVOLD, G. P. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, p. 705-713, 2003.

MURALIKRISHNA, G.; NIRMALA, M. Cereal α -amylases: an overview. **Carbohydrate polymers**, v. 60, p. 163-173, 2005

NELSON, L. R.; MARSHALL, D. Breeding wheat for resistance to *Septoria nodorum* and *Septoria tritici*. **Advances in Agronomy**, v. 44, p. 257-277, 1990.

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

NISHIMWE, K.; WANJUKI, I.; KARANGWA, C.; DARNELL, R.; HARVEY, J. An initial characterization of aflatoxin B₁ contamination of maize sold in the principal retail markets of Kigali, Rwanda. **Food Control**, v. 73, n. B, p. 574-580, 2017.

NOBRE, B. P.; VILLALOBOS, F.; BARRAGÁN, B. E.; OLIVEIRA, A. C.; BATISTA, A. P.; MARQUES, P. A. S. S.; MENDES, R. L.; SOVOVÁ, H.; PALAVRA, A. F.; GOUVEIA, L. A biorefinery from *Nannochloropsis* sp. microalga – Extraction of oils and pigments. Production of biohydrogen from the leftover biomass. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 128-136, 2013.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 459-466, 2003.

OLIVEIRA, M. S.; ROCHA, A.; SULYOK, M.; KRSKA, R.; MALLMANN, C. A. Natural mycotoxin contamination of maize (*Zea mays* L.) in the South region of Brazil. **Food Control**, v.73, n. B, p. 127-132, 2017.

OLIVEIRA, M. S.; BADIALE-FURLONG, E. Screening of antifungal and antimycotoxigenic activity of plant phenolic extracts. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, n. 2, p. 139-146, 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.

OLKKU, J.; SALMENKALLIO-MARTTILA, M.; SWEINS, H.; HOME, S. Connection between structure and quality of barley husk. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 63, n. 1, p. 17-22, 2005.

ONOFREJOVÁ, L.; VASICKOVÁ, J.; KLEJDUS, B.; STRATIL, P.; MISURCOVÁ, L.; KRÁČMAR, S.; KOPECKÝ, J.; VACEK, J. Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 2, p. 464-470, 2010.

PAGNUSSATT, F. A. **Inibição do crescimento de espécies do complexo *Fusarium graminearum* e da síntese de tricotecenos por compostos fenólicos livres e encapsulados**. 143f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2013.

PAGNUSSATT, F. A.; BRETANHA, C. C.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Extraction of fungal amylase inhibitors from cereal using response surface methodology. **International Research Journal Agricultural Science and Soil Science**, v. 1, p. 428-434, 2011.

PAGNUSSATT, F. A.; DE LIMA, V. R.; DORA, C. L.; COSTA, J. A. V.; PUTAUX, J. L.; BADIALE-FURLONG, E. Assessment of the encapsulation effect of phenolic compounds from *Spirulina* sp. LEB-18 on their antifusarium activities. **Food Chemistry**, v. 211, p. 616-623, 2016.

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

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

PAGNUSSATT, F. A.; MEZA, S. L. R.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Procedure to determine enzyme inhibitors activity in cereal seeds. **Journal of Agricultural Science**, v. 4, p. 85-92, 2012.

PALIWAL, C.; GHOSH, T.; GEORGE, B.; PANCH, I.; MAURYA, R.; CHOKSHI, K.; GHOSH, A.; MISHRA, S. Microalgal carotenoids: Potential nutraceutical compounds with chemotaxonomic importance. **Algal Research**, v. 15, p. 24-31, 2016.

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. 2997-301, 2009.

PARNIAKOV, O.; APICELLA, E.; KOUBAA, M.; BARBA, F. J.; GRIMI, N.; LEOVKA, N.; PATARO, G.; FERRARI, G.; VOROBIEV, E. Ultrasound-assisted green solvent extraction of high-added value compounds from microalgae *Nannochloropsis* spp. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 262-267, 2015.

PARRY, D. W.; JENKINSON, P.; MCLEOD, L. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals: A review. **Plant Pathology**, v. 44, p. 207-238, 1995.

PATRAS, A.; BRUNTON, N. P.; DOWNEY, G.; RAWSON, A.; WARRINER, K.; GERNIGON, G. Application of principal component and hierarchical cluster analysis to classify fruits and vegetables commonly consumed in Ireland based on *in vitro* antioxidant activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 250-256, 2011.

PAUL, P. A.; LIPPS, P. E.; HERSHMAN, D. E.; MCMULLEN, M. P.; DRAPER, M. A.; MADDEN, L. V. Efficacy of triazole-based fungicides for *Fusarium* head blight and deoxynivalenol control in wheat: A multivariate meta-analysis. **Phytopathology**, v. 98, p. 999-1011, 2008.

PIRGOZLIEV, S. R.; EDWARDS, S. G.; HARE, M. C.; JENKINSON, P. Strategies for the control of fusarium head blight in cereals. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, p. 731-742, 2003.

PLAZA, M.; HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Innovative natural functional ingredients from microalgae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 7159-7170, 2009.

POREP, J. U.; WALTER, R.; KORTEKAMP, A.; CARLE, R. Ergosterol as an objective indicator for grape rot and fungal biomass in grapes. **Food Control**, v. 37, p. 77-84, 2014.

POSNER, E.S. Wheat. In: KULP, K.; PONTE, J.G. **Handbook of cereal science and technology**. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 2000. p.1-29.

POZZI, C. R.; ARCARO, J. R. P.; ARCARO JÚNIOR, I.; FAGUNDES, H.; CORRÊA, B. Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de fumonisinas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 5, p. 901-907, 2002.

PRITSCH, C.; MUEHLBAUER, G. J.; BUSHNELL, W. R.; SOMERS, D. A.; VANCE, C. P. Fungal development and induction of defense response genes during early infection of wheat spikes by *Fusarium graminearum*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 13, n. 2, p. 159-169, 2000.

PRONYK, C.; ABRAMSON, D.; MUIR, W. E.; WHITE, N. D. G. Correlation of total ergosterol levels in stored canola with fungal deterioration. **Journal of Stored Products Research**, v. 42, p. 162-172, 2006.

QUIDEAU, S.; DEFFIEUX, D.; DOUAT-CASASSUS, C.; POUYÉGU, L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, p. 586-621, 2011.

RAKSHIT, S.; MANDAL, L.; PAL, B. C.; BAGCHI, J.; BISWAS, N.; CHAUDHURI, J.; CHOWDHURY, A. A.; MANNA, A.; CHAUDHURI, U.; KONAR, A.; MUKHERJEE, T.; JAISANKAR, P.; BANDYOPADHYAY, S. Involvement of ROS in chlorogenic acid-induced apoptosis of Bcr-Abl⁺ CML cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, p. 1662-1675, 2010.

RAO, V. T.; REDDY, P. S.; REDDEY, B. V. S.; KUMAR, A. A. Ergosterol as an indicator of mold resistance in white and colored grain sorghum hybrids. **Crop Protection**, v. 37, p. 7-12, 2012.

RASHIDINEJAD, A.; BIRCH, E. J.; EVERETT, D. W. Antioxidant activity and recovery of green tea catechins in full-fat cheese following gastrointestinal simulated digestion. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 48, p. 13-24, 2016.

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

RAVN, H.; ANDARY, C.; KAVACS, G.; MOLGAARD, P. Caffeic acid as *in vitro* inhibitors of plant pathogenic bacteria and fungi. **Biochemistry Systematics and Ecology**, v. 17, p. 174-184, 1989.

REIS, E. M.; BRUSTOLIN, R.; DE ROSSI, R.; BOLLER, W. Avanços na tecnologia de aplicação de fungicida visando ao controle da giberela em trigo. **Revista plantio direto**, ano XXI, ed. 133, p. 28-32, 2013.

REYNERI, A. The Role of Climatic Condition on Micotoxin Production in Cereal. **Veterinary Research Communications**, v. 30, p. 87-92, 2006.

RITCHIE, S. W.; HANWAY, J. J.; BENSON, G. O. **How a Corn Plant Develops**, Special Report no 48, Iowa State, University of Science and Technology, Ames, Iowa, 1993.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in food**. Human Nutrition Institute – International Life Sciences Institute, Washington, USA, 2001.

ROMANO, I.; BELLITTI, R.; NICOLAUS, B.; LICIA, L. M.; MANCA, M. C.; PAGNOTTA, E.; GAMBACORTA, A. Lipid profile: A useful chemotaxonomic marker for classification of a new cyanobacterium in *Spirulina* genus. **Phytochemistry**, v. 54, p. 289-294, 2000.

ROUSE, J. W.; HAAS, R. H.; SCHELL, J. A.; DEERING, D. W.; HARLAN, J. C. **Monitoring the vernal advancements and retrogradation of nature vegetation**. In: NASA/GSFC Final Report, Ed. MD, p. 371, 1974.

RUPOLLO, G.; GUTKOSKI, L. C.; MARTINS, I. R.; ELIAS, M. C. Effects of grain moisture and hermetic storage on fungi contamination and mycotoxin production in oats. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, n. 1, p. 118-125, 2006.

SALADINI, M.; BLANDINO, M.; REYNERI, A.; ALMA, A. The impact of insecticide treatments on *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae) and their influence on the

mycotoxin contamination of maize kernels. **Pest Management Science**, v. 64, p. 1170-1178, 2008.

SAMAPUNDO, S.; MEULENAER, B.; OSEI-NIMOH, D.; LAMBONI, Y.; DEBEVERE, J.; DEVLIEGHERE, F. Can phenolic compounds be used for the protection of corn from fungal invasion and mycotoxin contamination during storage? **Food Microbiology**, v. 24, p. 465-473, 2007.

SANTOS, J. S.; DEOLINDO, C. T. P.; ESMERINO, L. A.; GENOVESE, M. I.; FUJITA, A.; MARQUES, M. B.; ROSSO, N. D.; DAGUER, H.; VALESE, A. C.; GRANATO, D. Effects of time and extraction temperature on phenolic composition and functional properties of red rooibos (*Aspalathus linearis*). **Food Research International** (in press), v. 89, p. 476-487, 2016.

SANTOS, J. S.; ONO, E. Y. S.; ITANO, E. N.; HIROOKA, E. Y. Zearalenona e desoxinivalenol em trigo brasileiro – cenário sobre necessidade de monitoramento analítico. **Biosaúde**, v. 12, n. 1/2, 2010.

SAURA-CALIXTO, F.; GOÑI, I. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. **Food Chemistry**, v. 94, n. 3, p. 442-447, 2006.

SCAGLIONI, P. T.; DE SOUZA, T. D.; SCHMIDT, C. G.; BADIALE-FURLONG, E. Availability of free and bound phenolic compounds in rice after hydrothermal treatment. **Journal of Cereal Science**, v. 60, p. 526-532, 2014.

SCARPINO, V.; REYNERI, A.; SULYOK, M.; KRSKA, R.; BLANDINO, M. Effect of fungicide application to control *Fusarium* head blight and *Fusarium* and *Alternaria* mycotoxins in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). **World Mycotoxin Journal**, v. 8, n. 4, p. 499-510, 2015.

SCHÖNEBERG, A.; MUSA, T.; VOEGELE, R. T.; VOGELGSANG, S. The potential of antagonistic fungi for control of *Fusarium graminearum* and *Fusarium crookwellense* varies depending on the experimental approach. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, p. 1165-1179, 2015.

SEO, J. A.; LEE, Y. W. Natural occurrence of the C series of fumonisin in mouldy corn. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1331-1334, 1999.

SEUS, E. R. **Otimização de método para a determinação de tricotecenos em amostras de trigo**. 2014. 122f. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

SHAH, D. A.; BERGSTROM, G. C.; SORELLS, M. E. Differential seed infection of wheat cultivars by *Stagonospora nodorum*. **Plant Disease**, v. 84, p. 749-752, 2000.

SHANAB, S. M. M.; MOSTAFA, S. S. M.; SHALABY, E. A.; MAHMOUD, G. I. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 8, p. 608-615, 2012.

- SHAO, Y.; PAN, J.; ZHANG, C.; JIANG, L.; HE, Y. Detection in situ of carotenoid in microalgae by transmission spectroscopy. **Computers and Electronic in Agriculture**, v. 112, p. 121-127, 2015.
- SHEPARD, G. S. Chromatographic determination of the fumonisins mycotoxins **Journal of Chromatographi**, v. 185, n. 1, p.31-39, 1998.
- 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.
- SINGH, A.; BAJPAI, V.; KUMAR, S.; KUMAR, B.; SRIVASTAVA, M.; RAMESHKUMAR, K. B. Comparative profiling of phenolic compounds from different plant parts of six *Terminalia* species by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with chemometric analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 87, p. 236-246, 2016.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.
- SKROZA, D.; MEKINIC, I. G.; SVILOVIC, S.; SIMAT, V.; KATALINIC, V. Investigation of the potential synergistic effect of resveratrol with other phenolic compounds: A case of binary phenolic mixtures. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 38, p. 13-18, 2015.
- SNIJEDERS, C. H. A. *Fusarium* head blight and mycotoxin contamination of wheat, a review. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 96, n. 4, p. 187-198, 1990.
- SOBEK, E. A.; MUNKVOLD, G. P. European Corn Borer (Lepidoptera: Pyralidae) Larvae as Vectors of *Fusarium moniliforme*, Causing Kernel Rot and Symptomless Infection of Maize Kernels. **Journal of Economic Entomology**, v. 92, p. 503-509. 1999.
- SOUZA, E. J.; MARTIN, J. M.; GUTTIERI, M. J.; O'BRIEN, K. M. O.; HABERNICH, D. K.; LANNING, S. P.; McLEAN, R.; CARLSON, G. R.; TALBERT, L. E. Influence of genotype, environment and nitrogen management on spring wheat quality. **Crop Science**, v. 44, p. 425-432, 2004.
- SOUZA, M. M. **Potencial antifúngico e antioxidante dos extratos fenólicos de *Chlorella* sp. e *Spirulina platensis* e a capacidade desta de inibir a síntese de aflatoxinas**. 164f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.
- SOUZA, M. M.; PRIETO, 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, p. 1050-1058, 2011.
- SOVRANI, V.; BLANDINO, M.; SCARPINO, V.; REYNERI, A.; COISSON, J. D.; TRAVAGLIA, F.; LOCATELLI, M.; BORDIGA, M.; MONTELLA, R.; ARLORIO, M.

Bioactive compound content, antioxidant activity, deoxynivalenol and heavy metal contamination of pearled wheat fractions. **Food Chemistry**, v. 135, p. 39-46, 2012.

STAKHEEV, A. A.; RYAZANTSEV, D.; GAGKAEVA, T.; ZAVRIEV, S. K. PCR detection of *Fusarium* fungi with similar profiles of the produced mycotoxins. **Food Control**, v. 22, p. 462-468, 2011.

STANISZ, E.; ZGOLA-GRZESKOWIAK, A.; WASKIEWICZ, A.; STEPIEN, L.; BESZTERDA, M. Can ergosterol be an indicator of *Fusarium* fungi and mycotoxins in cereal products? **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, p. 705-712, 2015.

TANTAWY, S. T. A. Biological potential of cyanobacteria metabolites against some soil pathogenic fungi. **Journal of Food, Agriculture and 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.

TRAIL, F. For Blighted Waves of Grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era. **Plant Physiology**, v. 149, p. 103-110, 2009.

TURNER, P. C.; NIKIEMA, P. E.; WILD, C. P. Fumonisin contamination of food: progress in development of biomarkers to better assess human health risks. **Mutation Research**, v. 443, p. 81-93, 1999.

UDOMKUN, P.; WIREDU, A. N.; NAGLE, M.; BANDYOPADHYAY, R.; MÜLLER, J.; VANLAUWE, B. Mycotoxins in Sub-Saharan Africa: Present situation, socio-economic impact, awareness, and outlook. **Food Control**, v. 72, n. A, p. 110-122, 2017.

UE. **União Europeia**. Regulation (EC) No 1126/2007 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards *Fusarium* toxins. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32007R1126>. Acesso em: 30 de mar 2017.

USDA. **United States Department of Agriculture**. Research, Education and Economics – Statistics. Disponível em: <https://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>. Acesso em: 7 de jan 2017.

US-FDA. **United States Food and Drug Administration**. Guidance for Industry, Analytical Procedures and Methods Validation, 2000.

VÍLCHEZ, C.; LOBATO, M. V. Microalgae-mediated chemicals production and wastes removal. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, p. 562-572, 1997.

VON-DER, W. D.; DILLON, J. C. **Falquet J. Malnutrition: a silent massacre**. Geneve: Antenna Technology, 13p., 2000.

VOOREN, G. V.; LE-GRAND, F.; LEGRAND, J.; CUINÉ, S.; PELTIER, G.; PRUVOST, J. Investigation of fatty acids accumulation in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel application. **Bioresource Technology**, v. 124, p. 421-432, 2012.

WEGULO, S. N.; BAENZIGER, P. S.; HERNANDEZ-NOPSA, J.; BOCKUS, W. W.; HALLEN-ADAMS, H. Management of *Fusarium* head blight of wheat and barley. **Crop Protection**, v. 73, p. 100-107, 2015.

WIANOWSKA, D.; GARBACZEWSKA, S.; CIENIECKA-ROSLONKIEWICZ, A.; DAWIDOWICZ, A. L.; JANKOWSKA, A. Comparison of antifungal activity of extracts from different *Juglans regia* cultivars and juglone. **Microbial Pathogenesis**, v. 100, p. 263-267, 2016.

WIJFFELS, R. Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n.1, p. 26-31, 2007.

WOLF-HALL, C. E. Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 1-2, p. 89-94, 2007.

WU, F. Measuring the economic impacts of *Fusarium* toxins in animal feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, n. 3, p. 363-374, 2007.

XU, S. S.; FRIESEN, T. L.; CAI, X. **Sources and genetic control of resistance to *Stagonospora nodorum* blotch in wheat**. In: Research Signpost/recent research development in genetics and plant breeding. Book Chapter. v. 1, p. 449-469, 2004.

ZAO, Z.; WANG, Q.; WANG, K.; BRIAN, K.; LIU, C.; GU, Y. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 292-297, 2010.

ZITTELLI, G. C.; RODOLFI, L.; TREDICI, M. R. Industrial production of microalgal cell mass and secondary products – species of high potential. Mass cultivation of *Nannochloropsis* in closed systems. In RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Oxford: Blackwell Publishing, p.298-303, 2004.

ZOU, N.; ZHANG, C.; COHEN, Z.; RICHMOND, A. Production of cell mass and eicosapentaenoic acid (EPA) in ultrahigh cell density cultures of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). **European Journal of Phycology**, v.35, n.2, p.127-133, 2000.

ANEXO 1 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA PEROXIDASE

A Tabela 1 descreve o procedimento em sequência para a determinação da atividade da enzima peroxidase.

Tabela 1 - Procedimento para determinação da atividade enzimática da peroxidase.

Reagente (mL)	Controle	Enzima	Inibidor
Água destilada	3,0	2,0	1,5
Tampão fosfato*	1,5	1,5	1,5
-	Repouso 10 / 20 / 30 min		-
Extrato fenólico	-	-	0,5
Extrato enzimático	-	1,0	1,0
-	-	Repouso 10 / 20 / 30 min	Repouso 10 / 20 / 30 min
Guaiacol 1,0%	0,5	0,5	0,5
H ₂ O ₂ 0,08%	1,0	1,0	1,0

*tampão pH 6,0 20 mmol L⁻¹; - não adicionado.

Após a adição dos componentes, todos os tubos de ensaio foram mantidos em banho-maria a 30 °C durante 10 min e a transmitância dos produtos foi verificada em espectrofotômetro a 470 nm.

ANEXO 2 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA α -AMILASE

A Tabela 2 descreve o procedimento em sequência para a determinação da atividade da enzima α -amilase.

Tabela 1 - Procedimento para determinação da atividade enzimática da α -amilase.

Reagente (mL)	Controle	Enzima	Controle Inibidor	Inibidor
Tampão citrato-fosfato*	1,0	1,0	1,0	1,0
Água destilada	1,0	-	-	-
Extrato fenólico	-	-	1,0	1,0
Extrato enzimático	-	1,0	1,0	1,0
-	-	-	25 °C / 30 min	25 °C / 30 min
Amido 1%	1,0	1,0	-	1,0
-	25 °C / 30 min	25 °C / 30 min	-	25 °C / 30 min
HCl 0,5 mol L ⁻¹	0,05	0,05	0,05	0,05
-	-	-	25 °C / 30 min	-
Amido 1%	-	-	1,0	-
Iodo 0,5% em KI	0,1	0,1	0,1	0,1
Água destilada	1,85	1,85	0,85	0,85

*Tampão pH 6,0 0,1 mol L⁻¹; - não adicionado.

O conteúdo dos tubos foi homogeneizado, mantido por 30 min a pH 6 (tampão fosfato-citrato) em banho-maria a 25 °C, as transmitâncias foram medidas em espectrofotômetro a 620 nm.