

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

APLICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS NATURAIS EM PRODUTO DE
PANIFICAÇÃO: EFEITO CONSERVADOR E FUNCIONAL

ANELISE CHRIST RIBEIRO

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

Profa. Dra. Leonor Almeida de Souza Soares

Orientadora

Rio Grande, RS

2014

À minha mãe Eliana, minha irmã Gisele e meu marido Rafael.

Agradecimentos

À Deus pela vida e saúde, por me amparar e dar força interior para superar as dificuldades e me suprir em todas as minhas necessidades. Por ter me dado uma família, amigos e colegas maravilhosos.

À minha mãe Eliana, um ser iluminado ao qual tive a benção de poder ter como mãe e outras funções a qual ela desempenhou com todo amor e carinho durante todos esses anos. É o meu Deus na terra. Obrigado por tudo e para sempre amo-te “mil mundos colados” como desde pequena.

À minha irmã Gisele, por ser uma luz na minha vida também. Obrigado por tudo que fizeste por mim. Por às vezes deixar teus afazeres de lado pra me auxiliar, por toda atenção dada. Amo-te muito e para sempre.

Ao meu marido Rafael, agradeço por, sem exagero nenhum, toda a paciência que tiveste comigo, por seres essa pessoa maravilhosa e por me tratares como rainha. A minha felicidade só se tornou completa quando apareceste na minha vida. Obrigado por ser perfeito para mim, o amor da minha vida.

À minha família Eloí, Carlos Tadeu, Rodrigo, Rafaela, Eduardo, Carolina, João Guilherme, Manuela, Luiza, Guiomar, Ildefonso, Alice, Analice, Marcelo, Juliana e Marcos por todo o apoio durante todos esses anos. Amo vocês.

É por vocês que sempre fui e voltei de Rio Grande todos os dias durante esses anos todos. Amo vocês eternamente e sem vocês minha vida não teria sentido.

À minha orientadora Leonor, pessoa a qual não tenho palavras pra agradecer, que me acolheu e me fez acreditar que seria capaz de chegar aqui. Por toda a força e incentivo dado, se um dia conseguir chegar a ser a metade da mulher que és serei muito feliz e realizada. Admiro-te muito e almejo ser uma pessoa boa e profissional assim como és.

À prof. Eliana pelo conhecimento, conselhos e amizade. Se não fosse o teu convite para trabalhar no laboratório com certeza hoje eu não estaria escrevendo esta dissertação e descoberto este mundo que tanto amo. Sou eternamente agradecida por tudo.

À Michele, minha chefe, por ter sido uma inspiração e pelo incentivo a pesquisa, sempre me fazendo sentir que era especial e capaz além da disponibilidade de ajudar. Foste essencial na minha vida. Obrigado.

À Lidiane pela amizade e orientações. Posso afirmar que se este trabalho foi concluído foi graças a tua ajuda e dedicação. Muitas vezes deixando o teu trabalho de lado pra me ajudar. Fica o meu muito obrigado.

À Larine pela amizade e parceria neste trabalho. Pelo auxílio a mim dado e por ter tomado o teu tempo. Foste essencial neste trabalho. Obrigado por abrires mão do tempo do teu trabalho, para ajudares no meu.

À Luciana pela parceria neste trabalho, por dividir comigo o tempo pequeno que tinhas nos equipamentos. Obrigado pela amizade, paciência e carinho sempre.

Às minhas parceiras Adriana, Helen, Carolina, Paola, Ana Carla obrigada por tudo, sempre pude contar com vocês na hora do aperto. Obrigado por toda ajuda.

Aos colegas de laboratório Gabriela, Annie, Náthalie, Cristiana, Priscila, Taiana, Antônio, Muriele, Renata, Katherine, Fran, Paula, Fernanda, Lucielen, Jaqueline, “Gota”, Chiara, “Roxane”, “Elisabeth”, Tiago, “Cráudia”, Raquel e Mariane, sem vocês os dias teriam sido menos alegres e obrigado por aturarem a mim e as minhas brincadeiras.

Às amigas do ônibus Déborah, Dênisse, Sabrine e Pâmela, as 17:30 hs era uma alegria não só de voltar pra casa mas de conviver com vocês também.

À Jesus e Islanda por terem de me aturar por esses 2 anos, mas vocês foram maravilhosas e amigas. Sempre me ajudando. Adoro vocês.

Aos pesquisadores Fernanda Nedel, Flávio Demarco da UFPEL e Fábio Andrei da FURG e UFSM, por todo apoio oferecido às análises realizadas.

Ao Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da FURG pelas amostras de *Spirulina* sp. LEB-18.

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

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

A todos aquele que de alguma forma contribuíram com este trabalho!!!

O transtorno é passageiro e o benefício é duradouro.

Placa sobre a duplicação da BR 392.

RESUMO

É de grande importância para a segurança alimentar a melhoria nas práticas de higiene e produção de alimentos. A pizza é um dos alimentos mais consumidos nos últimos anos devido à grande praticidade do produto. Contudo, sofre intensa manipulação durante o processamento o que contribui para sua contaminação microbiológica, perda de qualidade e um intervalo restrito de vida útil. Na industrialização de pizzas faz-se o uso de agentes químicos para inibir o desenvolvimento de bolores e de outros micro-organismos, mas a eficiência destes é questionável, além da sua toxicidade. Deste modo, aditivos químicos vem sendo substituídos, com maior frequência, por conservadores naturais, pois além de enriquecerem com nutrientes o produto, podem aumentar a vida útil e contribuir com alternativas para a segurança alimentar. Dentre os conservadores naturais se destacam os compostos fenólicos. Estes podem ser obtidos de fontes tais como frutas, chás, microalgas e também oriundo de processos que utilizam micro-organismos que incrementam sua biodisponibilidade. Portanto, o objetivo do trabalho foi estudar os compostos fenólicos extraídos da microalga *Spirulina* sp. LEB-18 e do farelo de arroz integral fermentado por *Rhizopus oryzae*, para aplicá-los posteriormente como conservadores em massas de pizza e também proporcionar funcionalidade às mesmas. Os compostos fenólicos foram extraídos de *Spirulina* sp. LEB-18 e da biomassa de farelo de arroz integral fermentado com *Rhizopus oryzae* com metanol e quantificados colorimetricamente com reagente de Folin-Ciocalteu. Os extratos foram submetidos à avaliação de citotoxicidade, atividade antifúngica e antimicotoxicológica, e de acordo com os resultados foram escolhidos os extratos obtidos de farelo de arroz fermentado, com inibição da linhagem celular NIH/3T3 em 1,0 unidades de absorvância, 4,41 cm de diâmetro do crescimento micelial, 17,91 mg/g de glicosamina, 1,00 mg/g de ergosterol e 8,84 ng/g de ocratoxina A. Os compostos fenólicos extraídos do farelo de arroz fermentado foram aplicados como conservadores naturais, comparando-os com o conservador químico, em massas de pizza e avaliados em seus efeitos antifúngico, antioxidante e antimicotoxicológico durante o armazenamento em embalagens de polipropeno de 06 micras. Estes mostraram-se eficazes diminuindo a contaminação fúngica, preservando em até 21 dias as massas de pizza, além de inibirem o radical DPPH em 50% e reduzirem a produção de ocratoxina A e aflatoxinas G₂, G₁, B₂ e B₁ em relação ao controle e ao conservante químico adicionado.

Palavras chaves: antioxidantes, compostos fenólicos, conservadores naturais, farelo de arroz, fungos e micotoxinas.

ABSTRACT

It is of great importance for food security improvement in hygiene practices and food production. Pizza is one of the most consumed foods in recent years due to the great practicality of the product, however, suffers intense manipulation during processing that contributes to contamination, loss of quality and a limited range of shelf life. In the industrialization of pizza doughs the use of chemical agents to inhibit the growth of molds and other micro-organisms at these masses is necessary, but the efficiency of these is questionable, in addition to their toxicity. Thus, chemical additives have been replaced, more often, by natural conservatives, because as well as enriching the product with nutrients, can increase shelf life and contribute with solutions to food security. Among the natural conservatives phenolic compounds call attention. These can be obtained from sources such as fruits, teas, microalgae and/or residues resulting from the fermentation of cereals. Therefore, the objective was to select the best source of phenolic compounds extracted from *Spirulina* sp. LEB -18 or from fermented rice bran by *Rhizopus oryzae*, apply them as conservative in pizza doughs, adding functionality to it, and compare with the chemical conservative. Phenolic compounds were extracted from *Spirulina* sp. LEB -18 and from biomass of fermented rice bran by *Rhizopus oryzae* with methanol and quantified colorimetrically with Folin-Ciocalteu reagent. The extracts were examined for cytotoxicity, antimycotoxicological and antifungal activity, and based on the results were chosen those phenolic compounds of fermented rice bran that showed inhibition of NIH/3T3 cell line at 1.0 au, 4.41 cm diameter of mycelial growth, 17.91 mg.g⁻¹ glucosamine, 1.00 mg.g⁻¹ of ergosterol and 8.84 ng.g⁻¹ ochratoxin A. The phenolic compounds of fermented rice bran were applied as natural preservative, compared with the chemical conservative in pizza doughs, and antifungal, antioxidant and antimycotoxicological effects were evaluated during storage in packs of polypropylene of 06 microns. The phenolic compounds from fermented rice bran proved to be efficient in reducing the fungal contamination, preserving up to 21 days in the pizza doughs, besides inhibiting the DPPH radical 50% and decrease the production of aflatoxins G₂, G₁, B₂ and B₁ and ochratoxin A.

Keywords: antioxidants, phenolic compounds, natural preservatives, rice bran, molds and mycotoxins.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III – Desenvolvimento do trabalho

Artigo I

Tabela 1 – Diâmetros dos micélios do fungo *Penicillium verrucosum* obtidos nos diferentes tratamentos durante 9 dias.....30

Tabela 2 – Teores de glicosamina e de ergosterol produzidos pelo fungo *Penicillium verrucosum* sob diferentes tratamentos durante 9 dias.....32

Tabela 3 – Valores de OTA extraídas do fungo *Penicillium verrucosum* em diferentes tratamentos.....34

Artigo II

Tabela 1 – Compostos fenólicos obtidos de diferentes tempos de fermentação no farelo de arroz.....48

Tabela 2 – Análises microbiológicas de massas de pizza empregando diferentes conservadores e armazenados durante 21 dias.....49

Tabela 3 – Determinação de ocratoxina A e aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em massas de pizzas armazenadas com diferentes conservadores.....53

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II – Revisão da Literatura

- Figura 1** – Fotobiorreatores onde é realizado o cultivo de *Spirulina* sp. LEB-18 na planta de Santa Vitoria do Palmar (Rio Grande do Sul)8
- Figura 2** – Estrutura do grão de arroz.....9

CAPÍTULO III – Desenvolvimento do trabalho

Artigo I

- Figura 1** - Efeito dos compostos fenólicos de farelo de arroz fermentado, compostos fenólicos de *Spirulina* e propionato de cálcio, em diferentes concentrações, após exposição durante 24, 48 e 72 h, na inibição da linhagem celular NIH/3T3..... 29
- Figura 2** – Desenvolvimento de *Penicillium verrucosum* em diferentes condições..... 31

Artigo II

- Figura 1** – Massas de pizzas tratadas com conservador de CFFAF (a), propionato de cálcio (b) e controle (c) armazenados por 14 dias.....49
- Figura 2** – Massas de pizzas tratadas com conservador de CFFAF (a), propionato de cálcio (b) e controle (c) armazenados por 21 dias.....50
- Figura 3** – Quantificação dos compostos fenólicos dos extratos de massas de pizza empregando diferentes conservadores e armazenados durante 21 dias.....50
- Figura 4** – Percentagem de inibição dos radicais ABTS por extratos de massas de pizza empregando diferentes conservadores e armazenados durante 21 dias.....51
- Figura 5** – Percentagem de inibição dos radicais DPPH por extratos de massas de pizza empregando diferentes conservadores e armazenados durante 21 dias.....51

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO I | |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 3 |
| 2.1 Objetivo geral | 3 |
| 2.2 Objetivos específicos | 3 |
| 3. JUSTIFICATIVA | 5 |
| CAPÍTULO II | |
| 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 7 |
| 4.1 <i>Spirulina</i> sp. LEB-18 | 7 |
| 4.2 Farelo de arroz | 8 |
| 4.2.1 Fermentação em estado sólido (FES) | 10 |
| 4.3 Pizza x processos | 11 |
| 4.4 Fungos..... | 11 |
| 4.5 Compostos fenólicos..... | 13 |
| 4.6 Conservadores..... | 14 |
| 4.7 Risco de Contaminação | 15 |
| 4.8 Atividade antioxidante..... | 16 |
| 4.9 Micotoxinas | 17 |
| 4.9.1 Aflatoxinas..... | 18 |
| 4.9.2 Ocratoxinas | 19 |
| CAPÍTULO III | |
| Artigo I - Fontes alternativas naturais para conservadores de alimentos e estudo de suas citotoxicidade, atividade antifúngica e antimicotoxicológica | |
| 1. INTRODUÇÃO | 24 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 25 |
| 2.1 Materiais | 25 |
| 2.2 Obtenção dos conservadores..... | 25 |
| 2.3 Avaliação citotóxica | 26 |
| 2.3.1 Cultura de Células..... | 26 |
| 2.4 Determinação da citotoxicidade | 26 |
| 2.5 Avaliação da inibição Fúngica..... | 27 |
| 2.6 Determinação da área do micélio | 27 |
| 2.7 Determinação da glicosamina..... | 27 |
| 2.8 Determinação de ergosterol | 28 |
| 2.9 Extração e avaliação micotoxicológica..... | 28 |
| 2.10 Análise estatística | 28 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 29 |
| 3.1 Avaliação da inibição fúngica | 30 |
| 3.2 Avaliação micotoxicológica | 33 |
| 4. CONCLUSÃO..... | 35 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 36 |

Artigo II - Ocorrência de ocratoxina e aflatoxinas em massa de pizzas armazenadas com conservadores natural e químico

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 42 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 43 |
| 2.1 Materiais..... | 43 |
| 2.2 Obtenção dos compostos fenólicos | 43 |
| 2.3 Aplicação dos conservadores | 44 |
| 2.4 Avaliação da contaminação microbiana..... | 44 |
| 2.4.1 Determinação de Glicosamina | 44 |
| 2.4.2 Enumeração de Bolores e Leveduras | 45 |
| 2.5 Análise antioxidante..... | 45 |
| 2.5.1 Atividade antioxidante por DPPH..... | 45 |
| 2.5.2 Atividade antioxidante por ABTS..... | 46 |
| 2.6 Avaliação micotoxicológica..... | 46 |
| 2.6.1 Determinação e quantificação das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂ | 46 |
| 2.6.2 Determinação e quantificação de ocratoxina A..... | 47 |
| 2.7 Análise estatística..... | 47 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 47 |
| 3.1 Obtenção e aplicação dos conservadores | 47 |
| 3.2 Avaliação Antioxidante..... | 50 |
| 3.3 Determinação de Micotoxinas..... | 52 |
| 4. CONCLUSÃO | 55 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS | 56 |
| CAPÍTULO IV | |
| 5. CONCLUSÃO GERAL..... | 61 |
| CAPÍTULO V | |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS | 63 |

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO

Muitos estudos estão voltados a estratégias para produção de alimentos que ultrapassem a função de somente nutrir, ou seja, apresentem atividades funcionais. Dentre alguns exemplos de funcionalidade estão os compostos fenólicos que, são substâncias aromáticas hidroxiladas, cuja diversidade estrutural varia de simples molécula a polímeros encontrados naturalmente em cereais, hortaliças, frutas, chás, ervas, chocolate, café, vinho, microalgas e outros (POTRICKOS et al., 2013). Eles exibem uma ampla variedade de propriedades fisiológicas, tais como anti-alérgico, anti-microbiano, antioxidante, anti-trombótico, cardioprotetor e efeito vasodilatador (VICHAPONG et al., 2010; ARAUJO, 2011). Além do seu potencial funcional, decorrente de compostos antioxidantes presentes em sua composição, a perspectiva de atuarem como conservadores naturais também vêm norteando o interesse da comunidade científica (BIERHALS et al., 2009).

Os produtos de panificação, além de sofrerem variada manipulação durante o seu processamento, possuem alto teor de umidade, atividade de água e compostos químicos suficientes para torná-los uma ótima fonte de nutrientes para a contaminação, especialmente a microbiana, que resulta em riscos de diminuição da qualidade da vida útil e danos à saúde do consumidor (HEBEDA; ZOBEL, 1996; GIANNOU; KESSOGLO; TZIA, 2003). Fatores como a composição, manipulação, tipo de embalagem e condições de estocagem, contribuem com a rápida degradação do produto, principalmente devido à contaminação fúngica dos gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Penicillium* (FREIRE, 2011). Esses se destacam por ser produtores de micotoxinas como, Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ e Ocratoxina A, que podem causar danos agudos ou crônicos à saúde quando ingeridos (FREIRE et al., 2007).

A partir da constatação dos riscos resultantes do uso de conservadores químicos como casos de alergia, intolerância alimentar, mutações e alterações celulares nos casos mais graves, pesquisas são dedicadas a descobrir novos métodos e conservadores naturais, a fim de reduzir e/ou eliminar micro-organismos indesejáveis presentes nos alimentos sem prejudicar o organismo do consumidor. Outros estudos mostram ainda que o sistema nervoso central também é afetado pelo uso contínuo de aditivos alimentares (POLÔNIO; PERES, 2009, ARAUJO, 2011).

O farelo de arroz integral fermentado e a microalga *Spirulina* são matrizes que vem sendo estudadas no Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), por apresentarem resultados promissores, não somente como fonte de compostos fenólicos e suas consequentes atividades antioxidantes, omo também antifúngicas e antimicrobianas (OLIVEIRA et. al., 2007; SOUZA et. al., 2011). Diante do

exposto, o objetivo deste trabalho foi extrair compostos fenólicos de farelo de arroz fermentado e da microalga *Spirulina* cepa LEB 18/FURG, para posteriormente aplicá-los em produto de panificação, visando adicionar funcionalidade e inibindo o desenvolvimento fúngico e a produção de micotoxinas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Obter uma fonte natural alternativa à conservação tradicional de produtos de panificação proporcionando também funcionalidade.

2.2 Objetivos específicos

- Extrair compostos fenólicos da microalga *Spirulina* cepa LEB 18/FURG e do farelo de arroz integral fermentado por *Rhizopus oryzae*;
- Verificar os efeitos antifúngicos, antimicotoxigênicos e citotóxicos dos extratos obtidos da microalga e do farelo de arroz integral fermentado;
- Aplicar o composto fenólico de melhor efeito antifúngico, antimicotoxigênico e citotóxico em massas de pizza;
- Avaliar a inibição fúngica e a produção de micotoxinas ao longo do armazenamento dos produtos de panificação;
- Comparar a inibição da produção de micotoxinas dos extratos com a eficiência do conservador químico;
- Estimar a atividade antioxidante através da aplicação dos conservadores químicos de uso tradicional e do alternativo em massas de pizza.

CAPÍTULO II
REVISÃO DA LITERATURA

3. JUSTIFICATIVA

A panificação está entre os seis maiores segmentos industriais do país, e busca novos desafios e tecnologias, que permitam sua afirmação definitiva como setor de relevância no cenário econômico. O consumo brasileiro somente de pão chega a 33,5 Kg/hab/ano, existindo grandes diferenças regionais: no Sudeste o consumo é de 40 kg/per capita; no Nordeste, entre 18 e 20 kg; no Sul, 45 kg; no Centro-Oeste, entre 25 e 30 kg e na região Norte, 10 kg (OLIVEIRA; VITÓRIO; AMANAJÁS 2012).

A preocupação em produzir alimentos saudáveis e seguros vem norteando a busca por conservadores naturais na forma nativa ou extraídos de suas fontes. Diante disto, a ênfase das pesquisas está voltada para a identificação e purificação de novos compostos com atividade antifúngica provenientes destas fontes, que possam atuar sozinhos ou sinergicamente, inibindo a deterioração de alimentos e substituindo o uso dos antifúngicos químicos, como os compostos fenólicos.

Há um crescente interesse em explorar resíduos agrícolas para a obtenção de fitoquímicos e antioxidantes. A utilização eficiente de baixo custo e ambiental da indústria de subprodutos agro-alimentares é de indiscutível importância, principalmente para o contexto da agroindústria da região Sul do Brasil. Portanto, é de interesse conhecer o potencial de resíduos de subprodutos de arroz como fonte de conservadores naturais para extração e utilização na preservação natural de alimentos, permitindo a valorização de matérias-primas e subprodutos de baixo valor comercial (AMENDOLA; DE FAVERI; SPIGNO, 2010; SOUZA et. al., 2010 e KRISHNASWAMY et al., 2012).

Entre as formas de aumentar a disponibilidade de nutrientes em matérias-prima e resíduos da agroindústria estão os processos fermentativos, que implicam no emprego de micro-organismos para obter transformações resultantes da atividade metabólica dos mesmos. Estes processos podem tornar os alimentos mais nutritivos por aumentarem a digestibilidade e a palatabilidade tornando o odor mais agradável (FEDDERN et al., 2007). O emprego de farelo de arroz como substrato para a fermentação em estado sólido, sob determinadas condições, aumenta o teor de compostos fenólicos disponíveis na biomassa, e estes têm, também, se mostrado como promissores para inibição do crescimento fúngico (OLIVEIRA et al., 2009).

Espécies de microalgas, como a *Spirulina*, têm sido utilizadas mundialmente na alimentação humana e animal, por serem micro-organismos *Generally Recognized as Safe* (GRAS). Suas propriedades nutricionais têm sido relacionadas com possíveis atividades terapêuticas, principalmente pelo seu aporte fenólico, caracterizando-as no âmbito dos

alimentos funcionais e nutracêuticos. Alguns pesquisadores tem estudado também seu potencial como antimicrobiano e antifúngico (ABEDIN; TAHA, 2008; SOUZA et al., 2011; TANTAWY, 2011).

Por fim, é de extrema relevância o estudo dos compostos fenólicos destas matrizes, pois além de apresentarem funcionalidade, também são sinônimos de um alimento seguro pelo produto aplicado.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 *Spirulina* sp. LEB-18

Spirulina é a cianobactéria filamentosa mais conhecida e utilizada no Brasil. O componente em maior concentração em sua biomassa seca é a proteína, apresentando quantidades de 64 a 74%. Lipídeos e carboidratos variam entre 6 a 13% e 12 a 20%, respectivamente. Representa ainda uma riquíssima fonte de vitaminas, sais minerais, além de apresentar propriedades antioxidantes e anti mutagênicas devido à presença de compostos fenólicos, favorecendo assim o seu uso como alimento funcional (COLLA et al., 2007). No Brasil a ANVISA permite a sua comercialização desde que o produto final esteja devidamente registrado, e a recomendação diária de consumo do produto é de no máximo 1,6 g (BRASIL, 2009).

Os estudos científicos não documentam nenhuma toxicidade da microalga *Spirulina*, sendo considerado um microrganismo GRAS (*Generally Recognized as safe*), permitindo seu uso como suplemento alimentar pela FDA. É utilizada no desenvolvimento de alimentos funcionais e produtos nutracêuticos, visto que apresenta efeitos de promoção à saúde. Atualmente têm se dado grande atenção às suas propriedades antioxidantes, atribuídas aos compostos fenólicos (PARISI et al., 2010).

O meio padrão para cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 foi desenvolvido por Zarrouk (1996) e fornece entre outros nutrientes, carbono inorgânico na forma de CO_3^{-2} e HCO_3^{-} que se convertem em CO_2 utilizado na fotossíntese. A fonte de carbono constitui um dos maiores componentes de custo para produção de *Spirulina* e estudos concluíram estar o meio Zarrouk exclusivamente concentrado em nutrientes, de modo que se abre uma possibilidade de redução de custos de produção de cianobactérias. A *Spirulina*, ao contrário de outras cianobactérias, apresenta baixa susceptibilidade a contaminação de seus cultivos por outros micro-organismos devido ao seu alto pH, o qual se desenvolve, de modo que os fotobiorreatores para o cultivo podem ser abertos, sendo geralmente na forma retangular com cantos arredondados. A temperatura ótima de crescimento oscila em torno de 35°C.

Figura 1 – Fotobiorreatores onde é realizado o cultivo de *Spirulina* sp. LEB-18 na planta de Santa Vitoria do Palmar (Rio Grande do Sul).



Fonte: Laboratório de Engenharia Bioquímica – FURG

Apesar da *Spirulina* já ser utilizada na alimentação humana em tempos remotos, somente nos últimos anos se deu o início de sua produção e comercialização em grande escala. São numerosos os compostos presentes nessa microalga e possuem destacado valor comercial, pois são empregados em muitas atividades e para fins diversificados, tais como: biopigmentos e antioxidantes, marcadores fluorescentes, enzimas, fármacos, exopolissacarídeos, e diferentes nutrientes, como algumas vitaminas e proteínas, e alguns minerais, lipídios e carboidratos. As aplicações terapêuticas são: inibição da replicação viral; atividade antitumoral, redução da hipercolesterolemia e outras hiperlipidemias, efeito antidiabetogênico, efeito anti-hipertensivo, modulador do sistema imunológico e regulador da resposta alérgica, aumento da absorção intestinal de vitaminas e minerais, aumento dos lactobacilos intestinais; coadjuvante no tratamento de indivíduos obesos, anêmicos e redução da nefrotoxicidade por metais pesados e medicamentos (OLIVEIRA et al., 2013).

4.2 Farelo de arroz

O arroz (*Oryza sativa*) é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo, caracterizando-se como principal alimento para mais de 50% da população mundial. Sua importância é destacada principalmente em países em desenvolvimento, desempenhando papel estratégico em aspectos econômico e social (AVILA; MARCHEZAN; WALTER,

2008). Segundo levantamento do Instituto Rio Grandense do Arroz – IRGA (2011), o Rio Grande do Sul responde por cerca de 63% da produção nacional do grão.

As diferentes etapas do beneficiamento do grão para comercialização resultam nas seguintes frações: casca, farelo e arroz polido. O farelo representa de 8% a 11% do peso total do grão e é proveniente da cobertura externa logo abaixo da casca, sendo removido do arroz branco ou parboilizado, previamente descascado, durante o processo de polimento, quebrando a cobertura em pequenas partículas conforme a Figura 2. É constituído em grande parte pelo gérmen, o sistema reprodutivo do grão de arroz, portanto uma excelente fonte natural de nutrientes alimentares e micronutrientes (MALEKIAM et al., 2000; PESTANA; MENDONÇA; ZAMBIAZI, 2008).

Figura 2- Estrutura do grão de arroz.



Fonte: JOSAPAR (2012)

Diversos componentes do arroz presentes no farelo têm sido relacionados a diferentes efeitos no organismo. Pesquisadores relatam efeitos benéficos à saúde, como auxílio no controle da glicose sanguínea, redução dos lipídios séricos e da pressão arterial, entre outros, auxiliando na prevenção e no controle de doenças crônicas, como diabetes e doenças cardiovasculares (AVILA et al., 2008). Além disso, o aproveitamento do farelo é bastante viável devido à sua disponibilidade em nível regional, aliado ao baixo aproveitamento por ser considerado um resíduo. Este pode ser usado como substrato para a fermentação em estado sólido, uma vez que o conteúdo de carboidratos é bastante elevado, sendo este o nutriente preferencial para fungos (SILVEIRA; FURLONG, 2007).

Trabalhos realizados no Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos tem demonstrado o potencial da utilização deste rejeito industrial empregando em diversas áreas. De acordo com FEDDERN et al. (2007), OLIVEIRA et al. (2007), OLIVEIRA et al. (2009), SILVEIRA; FURLONG, (2007), SCHMIDT et al. (2014) a utilização do farelo de arroz como

substrato para a fermentação de micro-organismos alteraram fatores como os físico-químicos, disponibilização de nutrientes, fitoquímicos e entre outros.

4.2.1 Fermentação em estado sólido (FES)

Considerando-se o grande potencial do Brasil para a produção agrícola, há uma grande geração de resíduos ou subprodutos agroindustriais. Dentre as formas de aumentar a disponibilidade de nutrientes em matérias-primas e resíduos da agroindústria estão os processos fermentativos, que implicam no emprego de micro-organismos para obter transformações resultantes da atividade metabólica dos mesmos. Esses processos podem tornar os alimentos mais nutritivos por aumentarem a digestibilidade e a palatabilidade, tornando também o odor mais agradável (FEDDERN et al., 2007). Nesse sentido, a fermentação em estado sólido se apresenta como uma tecnologia capaz de propor caminhos alternativos para os resíduos gerados por meio da produção de substâncias de interesse econômico, como enzimas, hormônios, ácidos orgânicos, aromas, pigmentos e agentes de controle biológico de pragas, entre outros (PINTO et al., 2005).

O emprego de farelo de arroz como substrato para a fermentação em estado sólido sob determinadas condições aumenta o teor de compostos fenólicos disponíveis na biomassa. E estes têm também se mostrado como promissores para inibição do crescimento fúngico e micotóxico (OLIVEIRA et al., 2009).

A fermentação em estado sólido pode ser definida como “processo que se refere a cultura de micro-organismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida (substrato ou material inerte), onde o conteúdo de líquido (substrato ou meio umidificante) ligado a ela está a um nível de atividade de água que, por um lado, assegure o crescimento e metabolismo das células e, por outro, não exceda a máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (SCHMIDELL et al., 2001). Este tipo de fermentação possui vantagens como grande taxa de conversão devido ao contato direto entre o substrato e o micro-organismo; menor quantidade de água empregada, que reduz os custos de recuperação de produtos; aeração, natural ou forçada, acessibilidade aos micro-organismos; possibilidade de utilização direta, em alguns alimentos, menor produção de resíduos líquidos para tratamento; redução de riscos de contaminação e ausência de espuma (BORZANI et al., 2001).

Nesse contexto, a fermentação em estado sólido desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos sólidos como o farelo de arroz, pois, em virtude do crescimento microbiano, ocorre a síntese de diversos compostos, dos quais muitos apresentam grande interesse para segmentos industriais, além de ser economicamente importante do ponto

de vista ambiental, pois além de reduzir o impacto sobre a natureza agrega valor aos co-produtos agrícolas (PINTO et al., 2005). Visando maior produtividade e baixo custo na geração de tecnologia de produção e aproveitamento de resíduos, tem-se estudado algumas alternativas de utilização dos subprodutos da agroindústria, seleção de micro-organismos mais competitivos e adaptados a processos fermentativos (SINGHANIA et al., 2009).

4.3 Pizza x processos

A popularidade da pizza em relação aos outros produtos de forno é relativamente recente e a qualidade de sua massa continua sendo uma área pouco pesquisada. A massa de pizza é produzida, comumente a partir de farinha de trigo, devido às suas características de extensibilidade e viscoelasticidade, atribuídas às proteínas do glúten que auxiliam na retenção do gás (CO₂), possibilitando o desenvolvimento de um volume adequado dos produtos (WANG et al., 2005).

A qualidade geral de uma pizza depende principalmente da massa cujas propriedades são, sem dúvida, afetadas pelo processo de fermentação, além do tipo de farinha e procedimento de preparação, bem como pelas matérias-primas. A massa básica de pizza é geralmente preparada por um processo simples, utilizando farinha, água, sal, açúcar e leveduras de panificação como agente de fermentação (ORTIZ, 2011). Com isso, acaba sendo propensa a contaminação por micro-organismos acarretando uma vida útil, de 3 a 7 dias, para pizzas sem adição de conservantes.

As pizzas são diferenciadas pela espessura de sua massa, podendo ser finas ou espessas, redondas ou quadradas, sendo encontradas frescas ou resfriadas, prontas ou congeladas. Os recheios das pizzas são feitos com os mais variados sabores e temperos que podem conferir valor nutricional principalmente pelo aporte proteico dos produtos cárneos e queijos ou de compostos funcionais com atividade antioxidante, hipocolesterolêmica e outras (HEBEDA; ZOBEL, 1996).

4.4 Fungos

Os fungos são organismos vegetais, eucarióticos cujos núcleos são dispersos em um micélio contínuo ou septado e carente de clorofila, não possuem plastos ou pigmentos fotossintéticos. São heterotróficos, precisam de compostos orgânicos como fonte de energia e carbono, e saprófitas (decompõem resíduos complexos de plantas e animais, transformando-os em formas químicas mais simples, que retornam ao solo). Geralmente, os fungos suportam cargas mais severas que a maior parte dos micro-organismos como pH entre 2 e 9 e

temperaturas entre 0°C e 40°C. Mesmo necessitando de umidade para o seu desenvolvimento, os fungos filamentosos podem sobreviver em ambientes desidratados com baixa atividade de água, na faixa de 0,65 (produzindo esporos e entrando em estado de vida latente). Grande parte dos fungos são aeróbios, tendo o crescimento estimulado pelo fornecimento abundante de oxigênio. Além disso, possuem a capacidade de se desenvolver em substratos com alta concentração de açúcar (MICHEREFF, 2006).

A estrutura dos fungos é formada por uma massa de filamentos ramificados e entrelaçados, chamados hifas, cujo conjunto é denominado micélio. As hifas crescem rapidamente e a partir de um pedaço de micélio transplantado podem originar-se novos indivíduos que se reproduzem por meio de esporos assexuados, ou sexuados em algumas espécies (GRIFFIN, 1994).

A produção de biomassa fúngica abundante decorre da capacidade dos fungos em degradar uma ampla variedade de produtos vegetais complexos. Os fungos filamentosos *Rhizopus* e *Aspergillus* encontram-se entre os mais promissores na produção de biomassa, uma vez que além de elevarem o teor proteico, produzem proteínas com atividade catalítica específica. O gênero *Rhizopus* é especialmente importante, pela produção de proteínas com elevada digestibilidade e ausência de substâncias tóxicas (SILVEIRA; FURLONG, 2007).

Os fungos do gênero *Rhizopus* são classificados como zigomicetos e morfologicamente são fungos com hifas contínuas, formam uma massa citoplasmática multinucleada (hifas cenocíticas) e não formam corpo de frutificação. Na reprodução assexuada algumas hifas crescem na vertical e se diferenciam na extremidade, formando esporângios, estruturas constituintes dos esporos. Os esporângios são grandes e negros; quando maduros se desintegram liberando os esporos que germinam e formam novas massas de hifas. Na reprodução sexuada ocorre aproximação de duas hifas de indivíduos diferentes, as extremidades das mesmas se fundem originando um zigoto de parede espessa e resistente, denominado zigósporo. Este, passado o período de dormência, sofre meiose e germina originando um novo micélio (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1996).

O gênero *Rhizopus* apresenta crescimento rápido em diversos ambientes como solos e vegetais, especialmente naqueles contendo açúcares solúveis e amido, o que significa sua associação ao apodrecimento de frutas. Este gênero não possui espécies toxigênicas, fato que pode justificar a grande facilidade de contaminação de materiais onde eles se desenvolvem por outras espécies fúngicas, mas são adequados para emprego em processos fermentativos destinados a produção de insumos e alimentos (PITT; HOCKING, 1997).

Trabalhos realizados no Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos, desenvolvendo a fermentação do farelo de arroz pelo fungo *Rhizopus oryzae*, resultaram num aumento no teor proteico no substrato, conteúdo de fosfolipídios, disponibilização de ácidos graxos e compostos fenólicos com atividade antioxidante e anti micotoxicológico (OLIVEIRA et al., 2009; SILVEIRA; BADIALE-FURLONG, 2007).

4.5 Compostos fenólicos

O termo composto fenólico abrange um grupo de moléculas que possuem em comum um anel aromático substituído por uma ou mais hidroxilas (DOURADO, 2006). Compostos fenólicos compreendem substâncias diversas, entre elas estão os ácidos fenólicos, que possuem propriedades antioxidantes, os flavonoides, as antocianinas. Além disso, possuem comprovada ação antifúngica e esta pode ocorrer, entre outros mecanismos, pela inativação de sistemas enzimáticos do micro-organismo envolvidos na produção de energia e na síntese de componentes estruturais. Os ácidos fenólicos como o ferúlico, cinâmico e vanílico e seus derivados presentes em maior abundância nos cereais, são inibidores da multiplicação e esporulação fúngica. Porém a atividade inibitória depende não só da concentração, mas também da estrutura do composto fenólico (SOUZA et al., 2010).

Essas moléculas são consideradas produtos do metabolismo secundário que as plantas sintetizam durante seu desenvolvimento normal e em resposta às condições de estresse como infecções, ferimentos, radiação ultravioleta, dentre outros. Esses compostos ocorrem em várias porções das plantas e são um grupo de fitoquímicos muito diversificado derivado da fenilalanina e tirosina. Na planta, os fenólicos podem agir como fitoalexinas, atraentes para polinizadores, antioxidantes e protegem contra os raios ultravioletas. Nos alimentos, os fenólicos podem contribuir para o gosto amargo, adstringência, cor, odor, sabor e estabilidade oxidativa dos produtos (OLIVEIRA, 2011).

Os compostos fenólicos, proteínas, óleos essenciais e outros podem atuar na inibição de micro-organismos, como fungos, na síntese de componentes da parede celular como o glucan, a quitina, o ergosterol e as manoproteínas, destruindo a membrana e dificultando a entrada de nutrientes. Também a biossíntese de proteínas, aminoácidos e esfingolipídios podem interferir no transporte de elétrons, sendo afetados por estes compostos que inviabilizam a integridade da célula. Os óleos essenciais que possuem compostos com núcleo aromático e um grupo OH fenólico reativo, são capazes de formar pontes de hidrogênio com os sítios ativos de enzimas microbianas alvo inibindo-as (BRUL; KLIS, 1999). Além disso, possuem atividade antioxidante que é principalmente devida às suas

propriedades de óxido-redução, as quais podem desempenhar um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres, quelando o oxigênio triplete e singleto ou decompondo peróxidos (PESCHEL; SÁNCHEZ-RABANEDA; DIEKMANN, 2006). Estes efeitos demonstrados *in vitro* têm despertado o interesse técnico em aplicá-los para fins de conservação de alimentos ou para conferir as formulações à alegação de funcionalidade (OLIVEIRA et al, 2007).

4.6 Conservadores

Em variedades de alimentos e bebidas são utilizados ácidos orgânicos na forma de aditivos alimentares tais como acidulantes e conservadores com o objetivo de prolongar a vida útil dos alimentos. Em massas de panificação, por exemplo, é usado propionato de cálcio como conservador para prevenir a degradação e modificação por micro-organismos durante a armazenagem. O consumo excessivo de conservadores pode ser prejudicial para o corpo humano além de privilegiar a seleção de linhagens microbianas mais resistentes e, portanto, de difícil controle (YOSHIKAWA; SAITO; SAKURAGAWA, 2011; RODRIGUES, 2010).

Desde muito tempo tem-se conservado os alimentos com ácidos, especialmente o ácido acético (CH_3COOH) sob a forma de vinagre e seus sais, o acetato de sódio (CH_3COONa), acetato de potássio (CH_3COOK), acetato de cálcio [$(\text{CH}_3\text{-COO})_2\text{Ca}$] e o diacetato de sódio ($\text{CH}_3\text{-COONa} \cdot \text{CH}_3\text{-COOH} \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$). Estes sais são usados em panificação para inibir o crescimento fúngico sem afetar as leveduras fermentadoras. A atividade antimicrobiana do ácido acético, igual aos demais ácidos graxos alifáticos, aumenta ao diminuir o pH. Porém, esses ácidos são voláteis e parte é perdida durante o tratamento térmico aumentando as chances de contaminação durante a embalagem e armazenamento (BELITZ; GROSCH, 1988).

A escolha de um agente de conservação deve ser baseada no conhecimento do seu espectro antimicrobiano, as propriedades químicas e físicas tanto do alimento quanto do conservador, as condições de manuseio, processo e estocagem e, a segurança de uma alta qualidade inicial do alimento a ser conservado. Apesar de tais medidas quando aplicadas corretamente contribuir para a preservação dos alimentos, a cada ano são perdidos mundialmente toneladas de alimentos de boa qualidade, devido à contaminação microbiológica ou de toxinas produzidas pelos micro-organismos, fator que oferece sérios riscos à saúde do consumidor (TOLEDO et al., 2008).

O ácido propiônico ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-COOH}$) e seus sais de sódio e cálcio tem atividade antimicrobiana frente aos fungos e a um número reduzido de bactérias, possui ampla

utilização em panificação, inibindo com eficiência o desenvolvimento de bolores e leveduras. A ação dele sobre bolores e certas bactérias está relacionada com a incapacidade dos organismos metabolizarem o esqueleto de três átomos de carbono na sua forma ácida. Outro antimicrobiano muito utilizado em alimentos é o ácido benzóico, encontrando-se presente na forma natural de cravo e canela, eficazes contra leveduras e bactérias (TOLEDO et al., 2008).

O uso excessivo de aditivos químicos, muitos deles suspeitos de causar danos à saúde humana, tem levado a indústria a buscar novas alternativas, seja a utilização de processos que permitam a retirada dos conservadores ou a adoção de formas mais naturais para a manutenção e aumento da vida útil de produtos alimentícios (TASSOU; DROSINOS; NYCHAS, 1995). Esta busca vem demonstrando que extratos e óleos essenciais de vegetais podem desempenhar com sucesso o papel de antifúngicos, porém a volatilidade de alguns deles podem não garantir um período de vida útil adequado para comercialização (JUGLAL; GOVINDEN; ODHAV, 2002). Extratos de alguns condimentos, ervas de importância medicinal e outros vegetais que exibem propriedades antifúngicas vêm sendo explorados por seu potencial no controle do crescimento de fungos e consequente inibição da produção de micotoxinas (SOUZA et al., 2010).

4.7 Risco de Contaminação

A indústria de panificação vem aumentando e variando sua produção durante os últimos anos, e a pizza tornou-se muito popular. Ela é vendida pronta para consumo, congelada, refrigerada ou pré-cozida. Porém, esse produto sofre intensa manipulação durante o seu processamento, contribuindo para sua contaminação, diminuindo a qualidade e aumentando os riscos de doenças veiculadas por este alimento (BOTRE et al., 2010). Devido a sua qualidade higiênico-sanitária ser motivo de preocupação, uma vez que este tipo de alimento está sendo cada vez mais utilizado pela população consumidora, pode representar um elevado risco potencial, necessitando da imediata adoção de medidas que permitam uma efetiva pesquisa direcionada a contribuir, não só para sensibilizar as autoridades sanitárias, bem como alertar a população em geral a inspeção e/ou fiscalização deste produto (NÓBREGA et al., 2003).

A massa de pizza, por sua composição química, conservada em temperatura ambiente ou sob refrigeração, é um substrato potencial para o desenvolvimento fúngico. A presença destes micro-organismos pode ser atribuída a vários processos durante o fabrico ocorrido durante todo o processamento e até armazenamento da massa (NÓBREGA et al., 2003). Há outros fatores que podem ser propícios para a contaminação fúngica como pH,

temperatura, condições de armazenamento, atividade de água e umidade, sendo os últimos presente em alto teor em produtos de panificação em geral, em torno de 40%, inclusive nas pizzas (SCHIRMER et al., 2011).

Com os avanços e as mudanças do mundo moderno, os consumidores tendem a buscar a facilidade no preparo de alimentos, gerando, na indústria, a necessidade de uma crescente produção de alimentos prontos e semi prontos. A massa de pizza, embora produzida industrialmente como alimento semi pronto, apresenta crescimento de fungos na estocagem refrigerada onde pode acarretar a presença de micotoxinas (WANG et al., 2005).

4.8 Atividade antioxidante

Antioxidantes podem ser definidos como compostos ou substâncias químicas que inibem a oxidação, quando presente em baixa concentração comparada a do substrato oxidável, diminui ou inibe significativamente a oxidação do mesmo. Do ponto de vista biológico, pode se definir antioxidantes como compostos que protegem sistemas biológicos contra os efeitos potencialmente danosos de processos ou reações que promovem a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares (ROGINSKY; LISSI, 2005). Os antioxidantes naturais, tais como os compostos fenólicos, apresentam-se como uma alternativa para prevenir a deterioração oxidativa dos alimentos e minimizar os danos oxidativos nos seres vivos quando ingeridos com a dieta ou aplicados em alimentos (PESCHEL; SÁNCHEZ-RABANEDA; DIEKMANN, 2006).

Essas propriedades são justificadas pelo fato dos compostos fenólicos serem antioxidantes primários e agirem como sequestradores de radicais livres e bloqueadores de reações em cadeia. Tem-se estabelecido que a posição e o grau de hidroxilação é a principal importância na determinação da atividade antioxidante dos flavonoides. Assim, os antioxidantes fenólicos interagem preferencialmente com o radical peroxil por ser este mais prevalente na etapa de propagação da autooxidação e por possuir menor energia que outros radicais, fato que favorece a abstração do hidrogênio. O radical fenoxil resultante, embora relativamente estável, pode interferir na reação de propagação ao reagir com um radical peroxil, via interação entre radicais. O composto formado, por ação da luz ultravioleta e temperaturas elevadas, poderá originar novos radicais, comprometendo a eficiência do antioxidante, demonstrando que a eficácia de um antioxidante não se restringe a doar elétrons ou hidrogênio, sendo necessário que o radical fenoxil formado possua baixa reatividade, o que lhe é conferida pela ressonância de deslocamento do elétron desemparelhado em volta do anel aromático e pela ausência de sítios capazes de se ligar ao oxigênio (OLIVEIRA et al., 2011).

Estresse redox é definido como o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enxofre, entre outras, e a remoção destas pelos sistemas químicos e enzimáticos de defesa antioxidante e, também, pelo reparo enzimático das biomoléculas lesadas. As espécies reativas mais estudadas nos sistemas biológicos incluem as espécies reativas de oxigênio, as espécies reativas de nitrogênio, os radicais derivados de tióis (RS•), as espécies reativas de cloro, as espécies reativas de carbono e complexos de metais de transição, principalmente Fe, Cu, Mn e Cr. Há vários fatores que provocam o estresse redox como consumo de álcool, tabagismo, dieta inadequada, exercício físico realizado de forma extrema e exposição à radiação não ionizante ultravioleta e outras ondas curtas; condições ambientais impróprias como temperatura elevada e poluição ambiental, domiciliar e ocupacional; envelhecimento e estados psicológicos que provoquem estresse emocional além de patologias crônicas como diabetes mellitus, hipertensão arterial, câncer, entre outras e patologias degenerativas (Mal de Alzheimer e Mal de Parkinson) (OLIVEIRA et al., 2009a).

Os métodos ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) e DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) são mais utilizados para determinar a capacidade antioxidante *in vitro* (SUCUPIRA et al., 2012). Sendo o primeiro um radical catiônico que deve ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática, podendo ser dissolvido em meio aquoso ou orgânico, em que a atividade antioxidante pode ser medida, devido à natureza hidrofílica e lipofílica dos componentes das amostras (WOJDYLO; OSZMIANSKI; CZEMERYS, 2007). O segundo consiste na neutralização do radical livre DPPH• por antioxidantes presentes na amostra produzindo um decréscimo da absorbância. O método DPPH é descrito como um método simples, rápido e aplicado independentemente da polaridade da amostra, por isso vêm sendo amplamente utilizado para avaliar diversos tipos de extratos. A molécula de DPPH é caracterizada como um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Esta deslocalização confere a esta molécula uma coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em cerca de 520 nm (KOLEVA et al. 2001).

4.9 Micotoxinas

As toxinas produzidas por fungos filamentosos são denominadas de micotoxinas que constituem em metabólitos secundários, aparentemente sem qualquer função no metabolismo normal dos fungos. São moléculas diferenciadas com estruturas que variam de simples anéis heterocíclicos apresentando peso molecular de até 50 Da, a grupos de 6 a 8 anéis heterocíclicos irregularmente dispostos e com peso molecular total de 500 Da e que não

apresentam imunogenicidade. Estudos têm revelado a existência de, pelo menos, cerca de 400 diferentes micotoxinas (FREIRE et al., 2007).

São reconhecidos os efeitos deletérios desses compostos sobre a saúde humana e animal, sendo capazes de induzirem efeitos carcinogênicos, hepatotóxicos e mutagênicos. A crescente preocupação dos países importadores quanto à presença de micotoxinas nos alimentos tem levado à elaboração de legislações cada vez mais rígidas, no que concerne aos níveis máximos de micotoxinas permitidos. No Brasil, em 2011, foi publicado no Diário Oficial da União a RDC nº 7, de 18 de fevereiro, dispondo de limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos onde a finalidade foi estabelecer limites para as aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂ e M₁), ocratoxina A (OTA), desoxinivalenol (DON), fumonisinas (FB₁ + FB₂), patulina (PAT) e zearalenona (ZEA) para produtos prontos para o consumo e matérias-primas utilizadas na fabricação de alimentos.

Os produtos de panificação em todas as suas formas, em virtude de seu valor nutritivo, teor de umidade e atividade de água, está sujeito ao ataque por fungos, apresentando uma vida de prateleira que varia de 3 a 7 dias. Até o momento, os gêneros de fungos mais comumente encontrados têm sido: *Aspergillus*, *Chrysonilia*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor*, porém as espécies de *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Penicillium* ocorrem com maior frequência (FREIRE, 2011). As micotoxinas produzidas pelas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* (aflatoxinas, ocratoxina e patulina) são produzidas em sua maioria durante o armazenamento. Portanto, é de extrema importância avaliar se há a presença destes metabólitos secundários em produtos de panificação e encontrar meios de minimizar ou excluir esse tipo de toxina.

4.9.1 Aflatoxinas

O termo aflatoxina foi formado a partir do nome do seu principal agente produtor (*Aspergillus flavus* toxina) sendo que as mais conhecidas são denominadas de B₁, B₂, G₁ e G₂, com base na fluorescência delas sob luz ultravioleta (B de blue, G de green) e na sua mobilidade durante a realização de cromatografia de camada delgada. Alguns substratos são extremamente favoráveis ao crescimento de fungos aflatoxigênicos e à formação de aflatoxinas. A contaminação natural de cereais, sementes oleaginosas, amêndoas, especiarias e de outras commodities é ocorrência comum em inúmeros países. Tanto a habilidade genética para a formação de aflatoxinas, quanto a capacidade para a contaminação dos alimentos com essas toxinas, são altamente variáveis entre os fungos. Algumas culturas tornam-se contaminadas ainda no campo, antes da colheita, enquanto que outras se

contaminam após a colheita, quando são armazenadas em condições de elevada umidade e temperatura (VITORINO, 2011).

As aflatoxinas são facilmente absorvidas após ingestão, por serem moléculas de relativo baixo peso molecular e lipofílicas. O local de absorção é o intestino delgado, principalmente no duodeno, por difusão passiva onde estão sujeitas a processos de biotransformação. Em virtude da capacidade de se ligarem ao DNA das células, as aflatoxinas afetam a síntese proteica, além de contribuírem para a ocorrência da aplasia tímica (ausência congênita do timo e das paratireoides, com conseqüente deficiência da imunidade celular; também conhecida como síndrome de Di George). As aflatoxinas têm propriedades oncogênicas e imunossupressivas, induzindo infecções em pessoas contaminadas com essas substâncias (FREITAS et al., 2007).

4.9.2 Ocratoxinas

O grupo das ocratoxinas é composto por três tipos de substâncias, A, B e C, sendo a mais comum a ocratoxina A. Estas toxinas podem ser produzidas tanto pelo *Aspergillus ochraceus* ou *Aspergillus alutaceus*, quanto por outras cinco espécies de *Aspergillus* e ainda por seis espécies do gênero *Penicillium*. As ocratoxinas são ubiqüitárias tanto em climas tropicais quanto em climas temperados e são frequentemente encontradas na aveia, na cevada, no trigo e no milho (VITORINO, 2011).

A ocratoxina A além de ser reconhecidamente nefrotóxica, comporta-se, também, como hepatóxica, imuno-supressora, teratogênica e cancerígena. Ela tem sido encontrada no sangue e em outros tecidos animais e no leite, inclusive em leite humano, bem como em carne suína para consumo humano. Ocratoxina A tem sido responsabilizada pela nefropatia suína, amplamente estudada em países escandinavos. A doença é endêmica em suínos da Dinamarca, onde também está associada à morte de aves. É no ser humano, entretanto, onde essa substância tem a mais longa meia-vida para sua eliminação (FREITAS et al., 2007).

No Centro de Estudos Farmacêuticos da Universidade de Coimbra, o Instituto Superior de Engenharia do Porto, o Serviço de Bromatologia da Faculdade de Farmácia do Porto e Instituto Politécnico de Bragança, estudou sobre a presença de micotoxinas no pão fabricado no Porto, Alentejo, Algarve, Lisboa, Coimbra e Bragança. A análise laboratorial das mais de 500 amostras de pão recolhidas revela a presença da ocratoxina A, na maior parte das amostras analisadas (PAÍGA et al., 2012).

CAPÍTULO III
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Artigo I

Fontes alternativas naturais para conservadores de alimentos e estudo de suas citotoxicidade, atividade antifúngica e antimicotoxicológica.

RESUMO

Os conservantes químicos estão sendo cada vez mais questionados sobre seu efeito nocivo nos alimentos. Contudo, são componentes indispensáveis para a sua preservação. Por isso, torna-se essencial a procura de compostos naturais que possam exercer a mesma função sem apresentarem efeitos nocivos à saúde. O objetivo do trabalho foi investigar novos extratos naturais de compostos fenólicos extraídos da microalga *Spirulina* sp. LEB-18 e de farelo de arroz fermentado por *Rhizopus oryzae* que apresentem ação conservadora, comparando-os com o conservador químico, e estudá-los quanto à citotoxicidade, e efeitos antifúngicos e antimicotoxigênico frente ao *Penicillium verrucosum* - CCT 7680. Os compostos fenólicos do farelo de arroz mostraram resultados promissores, inibindo a linhagem celular NIH/3T3 em 1,0 unidades de absorbância, 4,41 cm de diâmetro do crescimento micelial, 17,91 mg.g⁻¹ de glicosamina, 1,0 mg.g⁻¹ de ergosterol e 8,84 ng.g⁻¹ de ocratoxina A.

Palavras-chaves: compostos fenólicos, farelo de arroz, propionato de cálcio e *Spirulina* sp. LEB-18.

ABSTRACT

Chemical preservatives are increasingly asked about their harmful effect on food. Yet they are essential components to preserve them. So, it is essential to search for natural compounds that may have the same function without you present harmful health effects. Therefore, the aim of this work was to seek new natural preservatives from the study of phenolic compounds present in *Spirulina* sp. LEB-18 and fermented rice bran by *Rhizopus oryzae*, comparing them with the chemical preservative, and study them for cytotoxicity and antifungal effect and anti mycotoxins (*Penicillium verrucosum*) CCT 7680. The phenolic compounds of rice bran showed promising results, inhibiting cell line NIH/3T3 Au at 1.0, 4.41 cm diameter of mycelial growth, 17.91 mg.g glucosamine⁻¹, 1.00 mg.g⁻¹ ergosterol and 8.84 ng.g⁻¹ of ochratoxin A.

Keywords: phenolic compounds, calcium propionate, rice bran and *Spirulina* sp. LEB-18.

1. INTRODUÇÃO

A busca por alimentos seguros tem estimulado pesquisas com novas substâncias que tenham a função de prevenir a contaminação microbiana. Aditivos químicos vêm sendo substituídos, com maior frequência, por conservadores naturais, pois além de enriquecer com nutrientes podem prevenir a deterioração microbiana, e aumentar a vida útil do produto, garantindo desta maneira, a segurança alimentar (PALUMBO; O'KEEFFE; ABBAS, 2008; BARROS et al., 2013).

Compostos fenólicos, extraídos de diversas fontes naturais, são alternativas interessantes à conservação de alimentos, pois inibem o desenvolvimento de micro-organismos deterioradores e patogênicos, através da inibição da síntese de componentes da parede celular, e de micotoxinas (SOUZA et al., 2011; ZABKA; PAVELA, 2013). Nesse último caso através da inativação de sistemas enzimáticos de fungos envolvidos na produção de energia e na síntese de componentes estruturais.

Além dos problemas quanto à qualidade do produto, como perda de valor comercial e não aceitação dos consumidores (FILHO, 2007; BURLANDY, 2008), a contaminação fúngica pode interferir na segurança alimentar, através da produção de micotoxinas, que podem causar danos aos animais e ao homem devido ao seu potencial tóxico, e estas consistem em diversos grupos de substâncias químicas resultantes de metabólitos secundários. Os piores efeitos das micotoxinas no homem tendem a ser crônicos, como indução de câncer, lesão renal e depressão do sistema imune (FREIRE et al., 2007; FIB, 2009).

Uma das micotoxinas mais frequentes e estudada é a ocratoxina A (OTA) que é produzida pelos fungos dos gêneros *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.*, principalmente pela espécie *Penicillium verrucosum*. Estudos demonstraram que a OTA é capaz de causar câncer de rim e de fígado em ratos, e está associada ao desenvolvimento de tumores no trato urinário humano (PEREIRA; SANTOS, 2011, VETTORAZZI; DELFT; CERAIN, 2013). Estas constatações indicam à necessidade da busca e aplicação de novos conservadores que previnam a entrada de micro-organismos toxigênicos na cadeia alimentar (RODRIGUEZ et al., 2011). Atualmente, estratégias ligadas à contenção do desenvolvimento fúngico e produção de micotoxinas são bastante estudadas, para tentar minimizar esses índices que preocupam órgãos do governo brasileiro limitando concentrações máximas de micotoxinas em produtos destinados ao consumo interno e à importação (ANVISA, 2011).

Além da comprovação da eficiência de um novo conservador de alimentos é preciso avaliar se, e qual quantidade, quando aplicada no alimento, pode trazer algum prejuízo

ao consumidor. Para isso, testes citotóxicos são utilizados para avaliar a atividade metabólica de células, trazendo boas respostas no estudo da aplicação de compostos naturais e até mesmo de uso tradicional para a alimentação humana (NEDEL et al., 2012).

O objetivo do trabalho foi buscar novos conservadores naturais a partir do estudo de compostos fenólicos presentes na *Spirulina* sp. LEB-18 e no farelo de arroz fermentado por *Rhizopus oryzae*, comparando-os com o conservador químico, e estudá-los quanto à citotoxicidade e efeito antifúngico e antimicotoxigênico frente ao *Penicillium verrucosum*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

O farelo de arroz desengordurado foi utilizado neste estudo como fonte de compostos fenólicos, o mesmo foi fornecido por uma indústria de óleo vegetal, localizada na cidade de Pelotas, no sul do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Do mesmo modo, a microalga *Spirulina* sp. Leb-18 foi fornecida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG.

A linhagem de células de fibroblastos embrionárias de rato (NIH/3T3) foi obtida a partir do Rio de Janeiro celular Bank (PABCAM da Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

Os micro-organismos *Penicillium verrucosum* CCT 7680 e *Rhizopus oryzae* CCT 7560 foram adquiridos do Banco de Colônias da Fundação Tropical André Tosello.

2.2 Obtenção dos conservadores

O fungo filamentosos utilizado para a fermentação foi o *Rhizopus oryzae* CCT 7560, tendo sido isolado de arroz e identificado antes do seu depósito na coleção. As culturas foram mantidas em Ágar Batata-dextrose (BDA) a 4°C e os esporos incubados durante 7 dias a 30 °C. Para a geração de biomassa foi utilizada a metodologia padronizada por Oliveira et al. (2009), consistindo em adicionar ao farelo de arroz uma solução nutriente (KH₂PO₄, MgSO₄, NH₂CONH₂ em HCl) e a suspensão de esporos na concentração inicial de 4x10⁶ esporos/g de farelo. A umidade do meio foi ajustada para aproximadamente 50% com adição de água estéril e as amostras foram incubadas a 30 °C, sendo retiradas no tempo de 48 horas por apresentar o maior teor de compostos fenólicos.

A extração dos compostos fenólicos foi realizada a frio utilizando álcool metílico como solvente extrator, em uma proporção de 1:8 (p/v) para o farelo de arroz fermentado e 1:5 (p/v) para a *Spirulina* LEB-18 e então a mistura foi homogeneizada em agitador

horizontal, a 160 rpm, durante 2 h a temperatura ambiente. Depois de repousar por 15 minutos, foi feita nova adição de 10 mL de solvente, e outro período de agitação de 1h.

Os extratos metanólicos foram secos em rotaevaporador e ressuspensos em água, logo após foram clarificados, centrifugados e filtrados para a obtenção dos compostos fenólicos. O conteúdo de fenóis totais, nos diferentes solventes foi quantificado através de método espectrofotométrico utilizando o reagente de Folin-Ciocateau em comprimento de onda de 750 nm e empregando uma curva padrão de ácido gálico (2 a 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (SOUZA et al., 2009).

2.3 Avaliação citotóxica

2.3.1 Cultura de Células

As células foram cultivadas em meio de Dulbecco modificado de Eagle (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), adquirido a partir de Cultilab (Campinas, Brasil) e Gibco (Grand Island, NY, EUA), respectivamente. As células foram cultivadas a 37 °C numa atmosfera de 95 % de ar umidificado e CO₂ a 5%. A experiência foi realizada com células em fase logarítmica de crescimento.

2.4 Determinação da citotoxicidade

A viabilidade das células NIH/3T3 foi determinada através da medida da redução do MTT solúvel [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil] de formazano insolúvel em água (HENN et al , 2011 ; NEDEL et al , 2012). Resumidamente, as células foram semeadas a uma densidade de 2×10^4 células por poço num volume de 100 μL em placas de 96 poços e incubadas a 37 °C numa atmosfera umidificada de 5 % de CO₂/95 % de ar durante 24 h. As células foram incubadas com concentrações baseadas de acordo com regulamento técnico sobre aditivos alimentares a ser empregados segundo as boas práticas de fabricação (BPF) (ANVISA, 2009), utilizando de 50 a 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de compostos fenólicos de farelo de arroz fermentado (CFFAF), compostos fenólicos de *Spirulina* (CFS) e Propionato de cálcio durante 24, 48 e 72 h, comparadas com o controle. Estes compostos foram dissolvidos em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com FBS (Fetal Bovine Serum) a 10% para as concentrações desejadas. Depois da incubação, o meio foi removido e 180 μL de DMEM e 20 μl de MTT (5 mg solução de MTT.mL⁻¹) foram adicionados a cada poço. As placas foram incubadas durante mais 4 h e o meio foi descartado. Foi adicionado a cada poço 200 μL de DMSO e o formazano foi solubilizado num agitador durante 5 minutos a 100 xg. A absorbância de cada poço foi determinada num leitor de microplacas (leitor de Thermo TP -

placa, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) a um comprimento de onda de 492 nm. Todas observações foram validadas por pelo menos três determinações independentes para cada experiência e as análises foram realizadas em duplicata.

2.5 Avaliação da inibição Fúngica

A inibição fúngica foi avaliada em cultivo em placas de Petri, onde foi adicionado o meio BDA (autoclavado e depois de refrigerado sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar) em conjunto com os diferentes tratamentos: controle - ágar BDA:água destilada (1:1 - v/v), extrato fenólico de *Spirulina* – ágar BDA:Fenol *Spirulina* (1:1- v/v), extrato fenólico de farelo de arroz– ágar BDA:Fenol de farelo de arroz fermentado (1:1 - v/v) e conservador químico – ágar BDA:propionato de cálcio (1:1 - v/v). Após solidificação do meio foi inoculado o fungo *Penicillium verrucosum*, no centro das placas, na concentração de 4×10^6 esporos.mL⁻¹ e estas foram incubadas em câmara de fermentação a 25 °C. As amostras foram retiradas no 2°, 3°, 5°, 7° e 9° dia e congelados para análises posteriores.

2.6 Determinação da área do micélio

O crescimento fúngico foi avaliado no 2°, 3°, 5°, 7° e 9° dias através de medidas ortogonais do diâmetro do micélio (SOUZA et al., 2010). Adicionalmente, as placas dos quatro testes (controle e três conservadores), foram fotografadas para análise visual do crescimento fúngico.

2.7 Determinação da glicosamina

A glicosamina produzida pelas micotas nas placas acrescidas dos três conservadores e do controle foi extraída por homogeneização em um misturador com HCl 6 M adicionado na proporção 3:5 (w/v). Cada mistura foi aquecida a 100 °C durante 20 minutos, neutralizada com NaOH 3 M, titulada com KHSO₄ a 1% e o volume completado em 25 mL com água destilada. A partir destas soluções, 1 mL foi transferido para tubos de ensaio, adicionados de 1 mL da solução de acetil acetona e encaminhados ao banho de água fervente durante 20 minutos. Após o resfriamento, foram adicionados 6 mL de etanol e 1 mL de reagente Erlich (2,67g DAB - p_dimetilaminobenzaldeído - dissolvido em 15 mL de etanol e 15 mL ácido clorídrico), mantendo-os em estufa a 65 °C durante 10 minutos. O teor de glicosamina foi determinado a 530 nm e a concentração estimada pela curva padrão de glicosamina (0,9 a 17,7 µg.mL⁻¹) (AIDOO; HENDRY; WOOD, 1981).

2.8 Determinação de ergosterol

O método modificado de Gutarowska e Zakowska (2009) foi usado para determinar o teor de ergosterol nas biomassas secas e consistiu na homogeneização de 0,1 g de cada amostra com 10 mL de metanol em agitador a 200 rpm durante 30 minutos. Após foram centrifugados a 3200 xg, a 20 °C durante 10 minutos. A seguir 20 mL de KOH metanólico foram adicionados aos sobrenadantes, e aquecidos, sob refluxo, durante 30 minutos e resfriados a 4 °C. Cada material foi submetido a quatro partições com 20 mL de hexano. As frações de hexano foram secas num evaporador rotativo a 60 °C. Os resíduos foram dissolvidos com 10 mL de metanol e determinados a 283 nm. O conteúdo de ergosterol foi estimado utilizando-se uma curva de calibração de ergosterol padrão cujas concentrações variaram 1.5 – 16.5 mg.mL⁻¹. O conteúdo ergosterol foi expresso em mL.g⁻¹ de biomassa seca.

2.9 Extração e avaliação micotoxicológica

Para a avaliação da ocratoxina A nas placas onde foram aplicados o fungo *Penicillium verrucosum*, foi utilizado o ágar BDA e os conservadores aplicados (1:1, v/v) de acordo com a metodologia de Kupski (2014), a qual consiste na adição de HCl e clorofórmio na amostra de ágar onde o fungo foi aplicado (1:5:15, v/v/v) e agitação em vórtex por 1 minuto. Logo em seguida foi centrifugado por 10 minutos a 5000 xg e a fração de clorofórmio retirada e aferido a 25 mL. Esta etapa foi repetida por mais duas vezes e alíquotas foram secas a 65 °C e reservadas para análise em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência. Esse, constituído por um sistema de bombas, desgaseificador da fase móvel, controlador, injetor manual com alça de amostragem de 20 µL e sistema de detecção por fluorescência. O controle do equipamento e aquisição dos dados foi feito pelo software LC Solution.

A corrida cromatográfica foi realizada a 35 °C, com vazão de 1,0 mL.min⁻¹ com detector de fluorescência (FL) nos comprimentos de onda de excitação e de emissão 333 nm e 460 nm, respectivamente. Os extratos secos foram ressuspensos em 1 mL da mistura de solventes que compõe a fase móvel (50% de Acetonitrila e 50% de água Milli Q acidificada 1% com ácido acético) e injetados no sistema cromatográfico (coluna Kromasil C18, 5µm, 250x4,6mm).

2.10 Análise estatística

Os resultados obtidos com os testes de inibição antifúngica e micotoxicológica foram tratados estatisticamente utilizando análise de variância ANOVA two-way e as médias

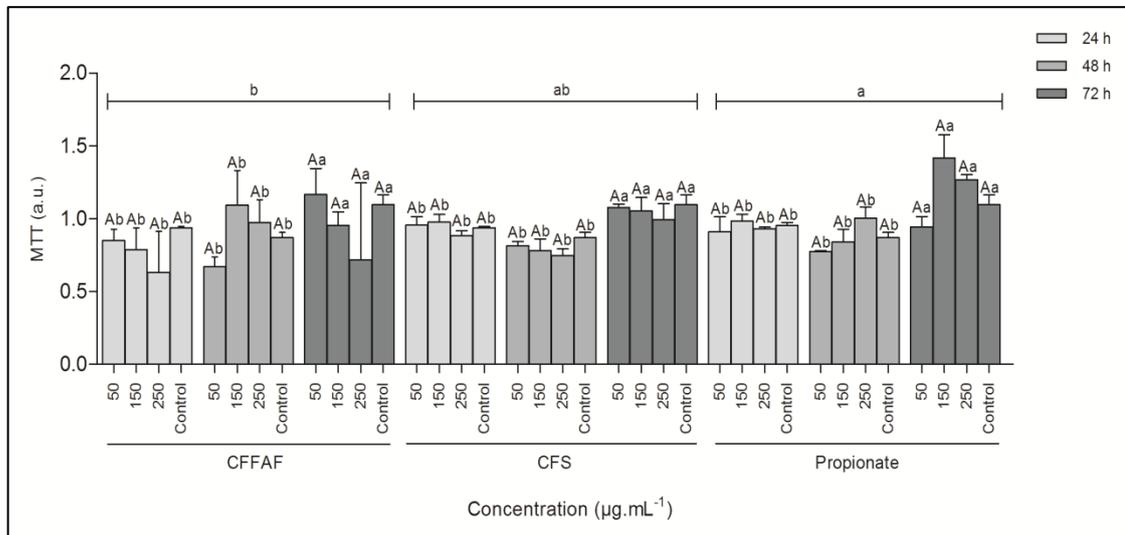
comparadas pelo teste de Tukey a um nível de significância de 5%, empregando o software *Statistica 7.0*. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em média \pm desvio padrão.

Os conjuntos de dados de ensaio de MTT foram analisados utilizando uma ANOVA three-way seguido por um teste de Tukey para comparações múltiplas. Três fatores foram considerados: o composto utilizado (três níveis), a concentração do composto (três níveis) e o período de exposição (três níveis). A significância foi considerada $p < 0,05$ em todas as análises. Os dados estão expressos como médias \pm SEM.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 estão apresentados os resultados da avaliação citotóxica dos conservadores, naturais e químico, aplicados na inibição da linhagem celular NIH/3T3 em diferentes concentrações nos tempo 24, 48 e 72h.

Figura 1 - Efeito dos compostos fenólicos de farelo de arroz fermentado, *Spirulina* e propionato de cálcio, em diferentes concentrações, após exposição durante 24, 48 e 72 h, na inibição da linhagem celular NIH/3T3.



Os dados são expressos como média \pm SEM. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre as concentrações e as letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. (|_|) Indica diferenças significativas entre o tipo de conservadores aplicados. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo (teste de Tukey). CFS – Compostos fenólicos extraídos da *Spirulina* sp. LEB-18. CFFAF - Compostos fenólicos extraídos do farelo de arroz fermentado por *Rhizopus oryzae*. Propionate – Conservador comercial.

Conforme a Figura 1 pode-se observar que não há diferença entre as concentrações utilizadas nos testes para nenhum dos conservadores aplicados evidenciando assim, a não toxicidade à célula estudada, até mesmo, em suas maiores concentrações. Também não houve diferença para os tempos de exposição de 24 e 48 horas, somente para o de 72 horas em todos os conservadores utilizados. Comparando a ação dos conservadores entre si verifica-se que o propionato de cálcio mostrou diferença significativa, apresentando maior atividade metabólica. Isto é, a medida da respiração celular que é proporcional ao número de células viáveis em cultura, verificada por meio de avaliação da redução de MTT das células NIH/3T3. Apesar deste resultado, os compostos fenólicos de farelo de arroz fermentado por *Rhizopus oryzae* e da microalga *Spirulina* sp. LEB-18 não apresentaram toxicidade às células, quando comparados aos tratamentos controle.

3.1 Avaliação da inibição fúngica

Para a avaliação microbiológica, foram calculadas e ajustadas às concentrações dos compostos fenólicos extraídos da microalga *Spirulina* LEB-18 e do farelo de arroz fermentado. A partir disso, foi elaborada a concentração do conservador químico (propionato de cálcio) para a aplicação nas placas. Estas concentrações para todos os tratamentos foram de $167 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Um dos parâmetros analisados para a avaliação da inibição fúngica foi o diâmetro do micélio, que foi medido em 3 direções durante os 2º, 3º, 5º, 7º e 9º dias.

Tabela 1 – Diâmetros dos micélios do fungo *Penicillium verrucosum* obtidos nos diferentes tratamentos durante 9 dias.

| | Dia | Tratamentos | | | |
|-------------------|-----|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | CFS | CFFAF | Propionato de cálcio | Controle |
| Diâmetros (cm) | 2º | 2,85 ^a | 2,84 ^a | 4,02 ^{b,c} | 3,68 ^{a,b,c} |
| | 3º | 3,58 ^{a,b,c} | 3,27 ^{a,b} | 4,22 ^{b,c,d} | 4,16 ^{b,c} |
| | 5º | 4,58 ^{c,d,e} | 4,08 ^{b,c} | 5,50 ^{e,f} | 5,25 ^{d,e,f} |
| | 7º | 5,54 ^{e,f} | 4,28 ^{b,c,d} | 5,72 ^f | 5,96 ^f |
| | 9º | 5,85 ^f | 4,41 ^{c,d} | 6,13 ^f | 7,33 ^g |

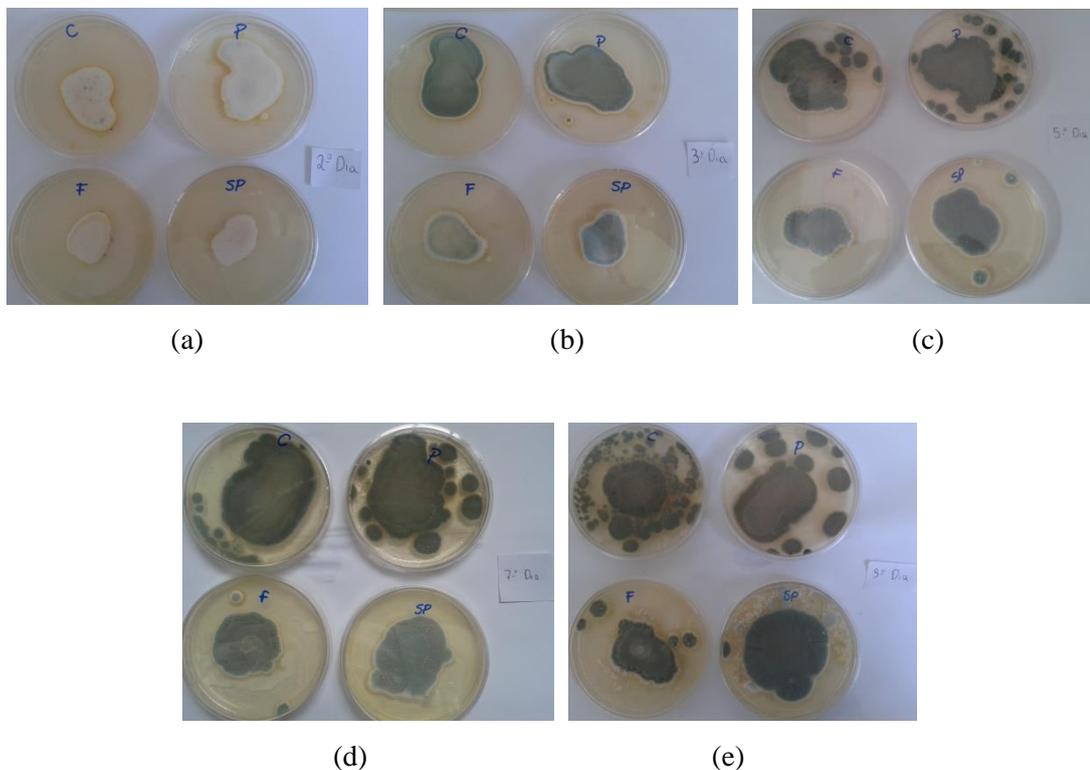
Letras iguais significam que não há diferença entre os tratamentos e dias utilizando o teste de Tukey.

Para todos os dias de cultivo, quando aplicado ao mesmo os compostos fenólicos, seja do farelo de arroz ou *Spirulina*, houve uma inibição do desenvolvimento do micélio do

fungo, quando comparado com o tratamento controle e com o tratamento com o conservador químico, mostrando que os compostos fenólicos agem como excelentes antifúngicos e apresentam melhores resultados do que os conservadores tradicionais (propionato), conforme a Tabela 1.

O tratamento que obteve a maior inibição fúngica, tanto no 2º, como no 9º dia, foi a de compostos fenólicos de farelo de arroz. Os tratamentos controle seguido do propionato de cálcio foram os que apresentaram os maiores crescimentos fúngicos, mostrando uma menor ação do conservador químico na barreira para o desenvolvimento de micro-organismos. Estes resultados podem ser visualizados na Figura 2.

Figura 2 – Inibição do desenvolvimento de *Penicillium verrucosum* em diferentes condições.



Sendo que (a) 2º dia - (b) 3º dia; (c) 5º dia - (d) 7º dia - e (e) 9º dia, em todos os casos, o tratamento controle está no canto superior esquerdo, propionato de cálcio no canto superior direito, extrato fenólico de farelo de arroz fermentado no canto inferior esquerdo; extrato fenólico de *Spirulina* sp. LEB-18 no canto inferior direito.

De acordo com Tantawy (2011) os extratos das algas (*Nostoc muscorum*, *Spirulina platensis* e *Anabaena flos-aquae*) apresentaram alta eficiência em inibir o crescimento do diâmetro micelial de fungos como *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani*. Tian et al., (2012) evidenciou no estudo de inibição do crescimento micelial de *Aspergillus*

flavus com a adição de óleo essencial de *Cinnamomum jensenianuma* eficácia deste óleo como barreira para o desenvolvimento fúngico.

Outras determinações utilizadas foram os teores de glicosamina e ergosterol (Tabela 2) que são indicativos de crescimento fúngico. A primeira é uma unidade monomérica da quitina - polímero constituinte da parede celular dos fungos. A segunda sendo um lipídio da classe dos esteróis faz parte da constituição da membrana citoplasmática, proporcionando boa relação com a biomassa metabolicamente ativa do fungo (HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2012).

Tabela 2 – Teores de glicosamina e de ergosterol produzidos pelo fungo *Penicillium verrucosum* sob diferentes tratamentos durante 9 dias.

| | | Tratamentos | | | |
|--------------------------------------|----|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | | CFS | CFFAF | Propionato de cálcio | Controle |
| Glicosamina (mg.g ⁻¹) | 2° | 4,26 ^{a,b} | 1,60 ^a | 8,59 ^{b,c} | 8,70 ^{b,c} |
| | 3° | 10,77 ^c | 9,10 ^{b,c} | 28,21 ^h | 21,97 ^{f,g} |
| | 5° | 15,74 ^{d,e} | 12,78 ^{c,d} | 33,79 ⁱ | 42,80 ^{j,k} |
| | 7° | 22,60 ^{f,g} | 17,01 ^{d,e} | 35,40 ⁱ | 43,61 ^{j,k} |
| | 9° | 23,64 ^{g,h} | 17,91 ^{e,f} | 49,78 ^l | 46,15 ^{k,l} |
| Ergosterol (mg.g ⁻¹) | 2° | 0,73 ^{b,c} | 0,56 ^a | 1,34 ^{f,g} | 1,44 ^{g,h} |
| | 3° | 1,01 ^d | 0,62 ^{a,b} | 1,51 ^h | 1,80 ⁱ |
| | 5° | 1,13 ^{d,e} | 0,78 ^c | 1,56 ^h | 2,08 ^j |
| | 7° | 1,15 ^{d,e} | 0,83 ^c | 1,87 ⁱ | 2,77 ^k |
| | 9° | 1,20 ^{e,f} | 1,00 ^d | 2,10 ^j | 2,94 ^l |

Letras iguais significam que não há diferença entre os tratamentos e dias para cada teste aplicado utilizando o teste de Tukey.

Conforme a Tabela 2, para o conteúdo de glicosamina, o tratamento utilizando compostos fenólicos do farelo de arroz fermentado mostrou ser eficaz na inibição do conteúdo da parede celular do fungo, corroborando com os resultados do crescimento micelial do patógeno. Os compostos fenólicos de *Spirulina* igualmente apresentaram bons resultados quanto à inibição da produção de glicosamina. O tratamento com o conservador químico (propionato de cálcio) apresentou valores menores que o controle até o 7° dia. Ao 9° dia apresentou valor maior do que o controle, indicando a ineficiência em limitar o desenvolvimento do *Penicillium verrucosum* durante todo o período. A avaliação do conteúdo

de ergosterol mostrou que os compostos fenólicos de ambas as fontes demonstraram novamente níveis mais baixo desse lipídeo e, conseqüentemente, menor disseminação fúngica. Os tratamentos controle e propionato de cálcio mostraram os maiores valores, em casos chegando a serem 52 e 66% maior que o tratamento de CFFAF, respectivamente. Estes resultados estão coerentes com a Tabela 1 e Figura 2, que realçam os compostos fenólicos com propriedades promissoras para atuarem como conservadores naturais visto à sua ação contra o desenvolvimento fúngico.

Este comportamento é explicado devido aos compostos fenólicos atuarem na inibição da biossíntese de componentes da parede celular como o glucan, a quitina, o ergosterol e as manoproteínas, destruindo a membrana e afetando o controle da entrada de nutrientes (SOUZA et al., 2011). Ainda atuam inibindo a síntese de proteínas, aminoácidos fúngicos, esfingolipídios e interferindo no transporte de elétrons, inviabilizando a integridade da célula (PAGNUSSAT et al., 2013). Os conservadores químicos apesar de exercerem mecanismos semelhantes, nem sempre geram uma atuação específica e eficiente, como no caso deste estudo, acarretando assim, na utilização de quantidades excedentes e na produção de resíduos, muitas vezes tóxicos prejudiciais a saúde (YOSHIKAWA et al., 2011).

Os compostos fenólicos do farelo de arroz fermentado pelo *Rhizopus oryzae* se diferenciam em relação aos da *Spirulina* LEB-18 por possuírem em sua maioria os ácidos ferúlico e clorogênico, enquanto que a microalga contém os ácidos gálico e cafeico. O ácido ferúlico que resulta dos compostos fenólicos totais do farelo de arroz fermentado pode ser aplicado como um precursor natural de vanilina (antioxidante natural e agente conservador em produtos alimentícios) e possui efeitos inibitórios no crescimento de fungos. Por isto, a fermentação nesta matéria prima é importante além de aumentar os níveis de compostos fenólicos em até 2 a 3 vezes (SCHMIDT et al., 2014).

Segundo Pagnussat et al. (2013) os valores de glicosamina e ergosterol confirmam a redução do crescimento de cepas toxigênicas de *Fusarium Graminearum* devido a utilização de compostos fenólicos como antifúngicos. Souza et al. (2011) estudando compostos fenólicos de *Spirulina platensis*, verificou um efeito antifúngico contra *Aspergillus flavus*, inibindo a produção de glicosamina em até 56% e de ergosterol em 29%.

3.2 Avaliação micotoxicológica

A Tabela 3 apresenta os resultados de OTA extraídas do fungo *Penicillium verrucosum* aplicado em diferentes tratamentos.

Tabela 3 – Valores de OTA extraídas do fungo *Penicillium verrucosum* em diferentes tratamentos.

| | Dia | Tratamentos | | | |
|------------------------------|-----|----------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|
| | | CFS | CFFAF | Propionato de cálcio | Controle |
| OTA (ng.g ⁻¹) | 2° | NQ | NQ | NQ | 0,80 ^a |
| | 3° | NQ | NQ | NQ | 12,80 ^{a,b} |
| | 5° | NQ | NQ | 17,08 ^{b,c,d} | 16,97 ^{b,c,d} |
| | 7° | 18,52 ^{b,c,d} | 13,28 ^{a,b,c} | 28,35 ^{c,d,e,f} | 41,56 ^f |
| | 9° | 26,27 ^{b,c,d,e,f} | 22,12 ^{b,c,d,e} | 29,39 ^{d,e,f} | 36,99 ^{e,f} |

NQ- Valor não quantificável. Letras iguais significam que não há diferença entre os tratamentos e dias utilizando o teste de Tukey.

Os tratamentos com compostos fenólicos além de prevenirem o desenvolvimento fúngico, também ocasionaram a diminuição da contaminação de OTA como mostram os resultados da Tabela 3. Destacando novamente os compostos fenólicos de farelo de arroz fermentado, o qual apresentou os menores valores para os níveis de OTA extraídos do meio onde o fungo *Penicillium verrucosum* foi aplicado, seguido dos compostos fenólicos de *Spirulina* LEB-18. Ambos os tratamentos não apresentaram teores que atingissem o limite de quantificação. Estes resultados são contrários ao do controle, apesar de possuírem as mesmas condições para a produção de micotoxina que os outros tratamentos, houve desenvolvimento de ocratoxina A com valores acima dos limites de quantificação, mostrando mais uma vez a eficiência desses compostos contra esta micotoxina.

Zabka e Pavela (2013) avaliaram a eficácia antifúngica de 21 componentes fenólicos de óleos essenciais e de substâncias das plantas contra fungos filamentosos com respeito às suas estruturas moleculares diferentes. Os autores observaram que alguns compostos fenólicos como o ácido caféico e ácido gálico (compostos abundantes na *Spirulina* LEB-18) mostraram as menores inibições fúngicas de *Penicillium brevicompactum* e *Penicillium expansum* de 21,95%, 12,90% e 14,63, 2,15%, respectivamente. Já o ácido ferúlico (composto abundante no farelo de arroz fermentado) inibiu os mesmos fungos em 56,1% e 66,67%.

Este desempenho dos compostos fenólicos se diferencia pelas estruturas moleculares. Onde a presença do grupo hidroxila e um sistema de elétrons deslocalizados desempenham papel importante na atividade da membrana celular de compostos fenólicos. A estrutura molecular e posição relativa dos grupos funcionais do ácido ferúlico são

responsáveis pela desestabilização da membrana celular que pode ser atribuído a maior eficiência na interrupção da transferência de prótons (RAO et al , 2010).

4. CONCLUSÃO

Os resultados indicam que os compostos fenólicos extraídos do farelo de arroz fermentado por *Rhizopus oryzae* apresentaram os melhores resultados, seguidos dos da *Spirulina* sp. LEB-18, os quais pelas avaliações citotóxicas, antifúngicas e antimicotoxigênicas confirmam a ausência de efeitos deletérios, e a viabilidade de utilizá-los como fontes de conservadores naturais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDOO, K.E.; HENDRY, R.; WOOD, B.J. Estimation of Fungal Growth in a Solid State Fermentation System. **Appl Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 6-9, 1981.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 51, de 15 de julho de 2009. Regulamento técnico sobre aditivos alimentares a ser empregados segundo as boas práticas de fabricação (BPF). **Diário Oficial da União** - Seção 1, n. 212, ISSN 1677-7042, 2009.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC Nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União** – Seção 1, n. 37, ISSN 1677-7042, 2011.

BARROS, L.; ALVES, C. T.; DUEÑAS, M.; SILVA, S.; OLIVEIRA, R.; CARVALHO, A. M.; HENRIQUES, M.; SANTOS-BUELGA, C.; FERREIRA, I. C.F.R. Characterization of phenolic compounds in wild medicinal flowers from Portugal by HPLC–DAD–ESI/MS and evaluation of antifungal properties. **Industrial Crops and Products**, 44, 104– 110, 2013.

BURLANDY, L. Segurança Alimentar e nutricional e Saúde Pública. **Cadernos de Saúde Pública**, 24 (7), 1464, 2008.

FILHO, M. B. O Brasil e a segurança alimentar. **Rev. Bras. Saude Mater. Infant.**, 7(2), 121-122, 2007.

FIB - **FOOD INGREDIENTS BRASIL**. As Micotoxinas. Nº 7, pag. 32-40, 2009

FREIRE, F. DAS C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal. – Fortaleza: **Embrapa Agroindústria Tropical**, 48 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 110). ISSN 1677-1915, 2007.

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

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; HACKBART, H. C. DOS S.; SOUZA, M. M. DE; BADIALE-FURLONG, E.; DORS, G. C.; & FAGUNDES, C. A. Determinação de deoxinivalenol e zearalenona em arroz natural e parboilizado e suas frações utilizando quEChERS e HPLC/UV-FL. **Química Nova**, 35(6), 1244-1249, 2012.

HENN, S.; NEDEL, F.; DE CARVALHO, R. V.; LUND, R. G.; CENCI, M. S.; PEREIRA-CENCI, T. Characterization of an antimicrobial dental resin adhesive containing zinc methacrylate. **J Mater Sci Mater Med**; 22:1797–802, 2011.

KUPSKI, L. Biodegradação enzimática de ocratoxina A. **Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos)** – Universidade Federal do Rio Grande – Rio Grande, 2014.

NEDEL, F.; CAMPOS, V. F.; ALVES, D.; MCBRIDE, A. J.; DELLAGOSTIN, O. A.; COLLARES, T.; SAVEGNAGO, L.; SEIXAS, F. K. Substituted diaryl diselenides: cytotoxic

and apoptotic effect in human colon adenocarcinoma cells. **Life Sci.** 24;91(9-10):345-52, 2012.

NEVES, J. M.; MATOS, C. M.; MOUTINHO, C. G.; GOMES, L. R.; TEIXEIRA, T. Actividade antioxidante e avaliação in vitro da citotoxicidade de extratos aquosos de folhas de mentha x piperita. **Revista da Faculdade Ciência e Saúde.** Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa. 6, 344-354, 2009.

OLIVEIRA, M. S.; KUPSKI, L.; FEDDERN, V.; CIPOLATTI, E. P.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L. A. de. Physico-chemical characterization of fermented rice bran biomass. **Food Science and Technology**, p. 7-11, 2009.

PAGNUSSATT, F. A.; KUPSKI, L.; DARLEY, F. T.; FILODA, P. F.; PONTE, É. M. D.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. *Fusarium graminearum* growth inhibition mechanism using phenolic compounds from *Spirulina sp.* **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 33(Supl. 1): 75-80, 2013.

PALUMBO, J.; O'KEEFFE, T.; ABBAS, H. Microbial interactions with mycotoxigenic fungi and mycotoxins. **Toxin Rev.** 27 (3-4), 261-285, 2008.

PEREIRA, K. C.; SANTOS, C. F. DOS. Micotoxinas e seu potencial carcinogênico. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, vol. 15, núm. 4, pp. 147-165, Universidade Anhanguera. Brasil. 2011.

RAO, A.; ZHANG, Y.Q.; MUEND, S.; RAO, R. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. **Antimicrob. Agents Chemother.** 54 (12), 5062-5069, 2010.

RODRÍGUEZ, A.; RODRÍGUEZ, M.; LUQUE, M. I.; JUSTESEN, A. F.; CÓRDOBA, J. J. Quantification of ochratoxin A-producing molds in food products by SYBR Green and TaqMan real-time PCR methods. **International Journal of Food Microbiology.** 149, 226-235, 2011.

SCHMIDT, C. G.; GONÇALVES, L. M.; PRIETTO, L.; HACKBART, H. S.; FURLONG, E. B. Antioxidant activity and enzyme inhibition of phenolic acids from fermented rice bran with fungus *Rizhopus oryzae*. **Food Chemistry**, 146, 371-377, 2014.

SOUZA, M. M.; RECARTE, M. R.; ROCHA, M.; CIPOLATTI, E. P.; FURLONG, E. B. Estudo das condições de extração de compostos fenólicos de cebola (*Allium cepa* L.). **Revista do Instituto Adolf Lutz**, v. 68, n.2, p. 192-200, 2009.

SOUZA, M. M. de; OLIVEIRA, M. dos S.; ROCHA, M. da; FURLONG, E. B. Avaliação da atividade antifúngica de extratos fenólicos de cebola, farelo de arroz e microalga *Chlorella phyrenoidosa*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 30(3): 680-685, 2010.

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

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

TIAN, J.; HUANG B.; LUO, X.; ZENG, H.; BAN, X.; HE, J.; WANG, Y. The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand.-Mazz essential oil and its potential use as a food preservative. **Food Chemistry**, v. 130, n. 3, p. 520-527, 2012.

VETTORAZZI, A.; DELFT, J. VAN; CERAIN, A. L. DE. A review on ochratoxin A transcriptomic studies. **Food and Chemical Toxicology** 59, 766–783, 2013.

ZABKA, M.; PAVELA, R. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. **Chemosphere** 93, 1051–1056, 2013.

ZHANG, Y.; ONG, C. N.; SHEN, H. M. Involvement of proapoptotic Bcl-2 family members in parthenolide induced mitochondrial dysfunction and apoptosis. **Cancer Lett**; 211 (2): 175-88, 2004.

YOSHIKAWA, K.; SAITO, S.; SAKURAGAWA, A. Simultaneous analysis of acidulants and preservatives in food samples by using capillary zone electrophoresis with indirect UV detection. **Food Chemistry**, 127, 1385–1390, 2011.

Artigo II

Ocorrência de ocratoxina e aflatoxinas em massas de pizzas armazenadas com conservador natural e químico

RESUMO

São diversas as estratégias utilizadas pelas indústrias de alimentos para reduzir os perigos biológicos presentes nesses e, conseqüentemente, reduzir a deterioração microbiana e até mesmo o risco de doenças transmitidas por alimentos, garantindo assim um alimento seguro ao consumidor. Entre a mais antiga e comum está a conservação química, entretanto, atualmente, muitos compostos naturais têm sido estudados. Assim, o principal objetivo deste trabalho foi aplicar compostos fenólicos como conservadores naturais e compará-los com o conservador químico propionato de cálcio através da verificação da sua eficácia em inibir a contaminação fúngica, micotoxicológica e do seu potencial antioxidante em massas de pizza durante 21 dias. Resultados demonstraram que os compostos fenólicos aplicados como conservador foram mais eficientes do que o conservador químico e o controle, diminuindo a contaminação fúngica e preservando em até 21 dias as massas de pizza, além de inibir o radical DPPH em 50% e diminuir a produção de ocratoxina A e aflatoxinas G₂, G₁, B₂ e B₁.

Palavras-chaves: antifúngico, antioxidante, compostos fenólicos, farelo de arroz, micotoxinas e propionato de cálcio.

ABSTRACT

There are several strategies used by the food industry to reduce biological hazards present in these and hence reduce microbial spoilage and even the risk of foodborne illness, thus ensuring a safe food to consumers. Among the oldest and most common is the chemical preservation, however, currently, many natural compounds have been studied. Thus, the main objective of this work was to apply phenolic compounds as natural conservatives and compare them with the conservative chemical, calcium propionate, by verifying their effectiveness in inhibiting fungal, anti mycotoxins and their antioxidant potential in pizza doughs contamination during 21 days. Results showed that the phenolic compounds applied as a preservative were more efficient than chemical conservative and controlling, reducing the fungal contamination and maintaining within 21 days, the pizza doughs, besides inhibiting the DPPH radical 50% and decrease the production of ochratoxin A and aflatoxins G₂, G₁, B₂ and B₁.

Keywords: antifungal, antioxidant, phenolic compounds, rice bran, mycotoxins, and calcium propionate.

1. INTRODUÇÃO

Produtos de panificação são considerados alimentos básicos em grande parte do mundo, em contrapartida são altamente susceptíveis às alterações físico-químicas e microbiológicas. Essas reduzem significativamente o prazo de validade dos alimentos, causando prejuízos econômicos tanto para as indústrias de panificação, como para os consumidores. Fungos, entre eles, bolores e leveduras, são os principais causadores de alterações desses alimentos, sendo responsáveis pela formação de sabores estranhos, produção de micotoxinas e compostos alergênicos, que podem ser formados mesmo antes do crescimento visível do micro-organismo (RYAN et al., 2011).

Atualmente, os consumidores estão cada vez mais preocupados com a segurança alimentar, ou seja, que não ofereça perigo físico, químico e/ou biológico. Assim, busca-se um alimento que apresente, além da qualidade sensorial e nutricional, a segurança sanitária através da aplicação de combinados fatores conservativos a fim de proporcionar uma barreira adicional para a deterioração microbiana (LEISTNER, 2000). E devido a essa busca indústrias de panificação tem investido em pesquisas para reduzir a quantidade de conservantes ou até mesmo substituí-los por substâncias naturais (HUTTON, 2003; SUHR; NIELSEN, 2004). O desafio de aumentar a vida útil dos alimentos sem comprometer a nutrição, características funcionais e sensoriais de alimentos criou um crescente interesse por melhorias nas tecnologias existentes e pelo desenvolvimento de métodos de preservação de alimentos (PARDO; ZUFÍA, 2012).

Segundo Freire (2011) produtos de panificação quando submetidos ao forneamento são estéreis, tornando-se contaminados somente durante o resfriamento, operação de corte (fatiagem) ou de embalagem, pois propágulos bacterianos vegetativos, leveduras, fungos e vírus são eliminados durante o processo de cozimento. Os principais fungos envolvidos na deterioração de pães e pizzas pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Mucor* (CIZEIKIENE et al., 2013). Alguns deles são produtores de micotoxinas, e, em alimentos com alto teor de carboidratos são favoráveis à produção das aflatoxinas e ocratoxina A, consideradas de risco à saúde humana e animal (IAMANAKA; OLIVEIRA; TANIWAKI, 2010).

Assim, uma alternativa promissora, inovadora e para substituição da utilização tradicional de conservantes nos alimentos são os compostos fenólicos, que em estudos recentemente publicados, mostraram sua capacidade antifúngica, antimicotoxina e antioxidante, podendo ser empregados para tal função sob processo de submersão, formando

uma camada externa protetora para prolongar a vida útil (SOUZA et al., 2010; VAQUERO et al., 2010, PRAKASH et al., 2012, GONZÁLEZ-ROMPINELLI et al., 2013).

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi aplicar compostos fenólicos como conservador natural em massas de pizza e comparar com o conservador químico (propionato de cálcio) a sua eficácia em inibir a contaminação fúngica, micotoxicológica e o seu potencial antioxidante durante o período de 21 dias.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

A matéria prima utilizada como fonte de compostos fenólicos foi o farelo de arroz, fornecido por uma indústria de óleo vegetal, localizada na cidade de Pelotas, no sul do estado do Rio Grande do Sul.

As massas de pizza foram formuladas conforme Giannou et al., (2003). Os ingredientes da massa foram estabelecidos com base no peso da farinha, sendo que a formulação usada foi de 100 g farinha, tipo 1, fortificada com ferro e ácido fólico (100 %), açúcar cristal (4 %), sal refinado (2 %), óleo de soja (3 %), fermento biológico fresco (2 %) e água potável filtrada (60 - 70 %), na temperatura de 5 °C.

O micro-organismo utilizado para a fermentação em estado sólido foi o *Rhizopus oryzae* CCT 7560 (Banco de Colônias da Fundação Tropical André Tosello).

2.2 Obtenção dos compostos fenólicos

O micro-organismo utilizado para a fermentação foi o *Rhizopus oryzae* CCT 7560 (Banco de Colônias da Fundação Tropical André Tosello), tendo sido isolado de arroz e identificado antes do seu depósito na coleção. As culturas foram mantidas em Ágar Batata-dextrose (BDA) a 4°C e os esporos incubados durante 7 dias a 30°C. Para originar a biomassa foi utilizada a metodologia padronizada por Oliveira et al. (2009), consistindo em adicionar ao substrato (farelo de arroz) uma solução nutriente (KH₂PO₄, MgSO₄, NH₂CONH₂ em HCl) e a suspensão de esporos na concentração inicial de 4x10⁶ esporos/g de farelo do fungo. A umidade do meio foi ajustada para aproximadamente 50% com adição de água estéril. As amostras de farelos fermentados foram retiradas nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 horas e utilizado o que apresentou maior rendimento de compostos fenólicos.

A extração dos compostos fenólicos foi realizada a frio a partir de 1:8 (p/v) de álcool metílico para o farelo de arroz fermentado 1:5 (p/v). Logo após foram homogeneizados em agitador horizontal, a 160 rpm, durante 2 horas a temperatura ambiente (25 °C). Depois de

repousar por 15 minutos, foi feita nova adição de 10 mL de solvente, e outro período de agitação de 1 hora.

Os extratos metanólicos foram secos em rotaevaporador e ressuspensos em água, logo após foram clarificados, centrifugados e filtrados para a obtenção dos compostos fenólicos. O conteúdo de fenóis totais foi quantificado através de método espectrofotométrico utilizando o reagente de Folin-Ciocateau em comprimento de onda de 750 nm e empregando uma curva padrão de ácido gálico (2 a 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (SOUZA et al., 2009).

2.3 Aplicação dos conservadores

Discos de massas de pizza foram submergidos após o forneamento em extratos aquosos de compostos fenólicos de farelo de arroz fermentado, propionato de cálcio e controle a fim de formar uma camada externa para a prevenção da contaminação após o forneamento. Os testes foram dimensionados totalizando em 5 discos de massa para cada dia analisado e tratamento aplicado.

Esta imersão foi efetuada durante 10 segundos para que houvesse penetração das soluções conservantes na camada superficial das massas de pizza, de acordo com a metodologia de Christ-Ribeiro et al. (2011). A absorção foi determinada de acordo com a diferença do volume final e o inicial e calculada a concentração dos conservadores aplicados nas massas de pizza.

Logo em seguida, os discos de pizza foram levados ao forno a 200 °C para a completa secagem da camada externa dos conservadores. Após esta etapa e do resfriamento, foram armazenados em embalagens de polipropileno de espessura 0,6 micras a temperatura ambiente (25 °C).

O efeito inibitório da contaminação fúngica foi avaliado a partir da análise de aspectos físico-químicos e microbiológicos das massas no 1°, 7°, 14° e 21° dia. Para todas as massas tratadas com os conservadores As condições das massas tratadas com os conservadores foram as mesmas em todos os casos, inclusive no controle que consiste somente na adição de água.

2.4 Avaliação da contaminação microbiana

2.4.1 Determinação de Glicosamina

A glicosamina produzida pela micota nos discos de pizza foi extraída por homogeneização num misturador, com HCl 6 M adicionado na proporção 3:5 (w / v). A mistura foi aquecida a 100 °C durante 20 minutos, neutralizada com NaOH 3 M, titulada com

KHSO₄ a 1%, e o volume completado com água destilada a 25 mL. A partir desta solução, 1 ml foi transferido para tubo de ensaio, adicionando 1 mL de uma solução de acetil acetona, levando a mistura em banho à 100 °C durante 20 minutos. Após o resfriamento adicionou-se 6 mL de etanol e 1 mL de reagente Erlich (2,67g DAB - p_dimetilaminobenzaldeído - dissolvido em 15 mL de etanol e 15 mL ácido clorídrico), mantendo em estufa a 65 °C durante 10 minutos. O teor de glicosamina foi determinado a 530 nm e a concentração estimados pela curva padrão de glicosamina (0,9 a 17,7 ug / mL) (AIDOO; HENDRY; WOOD, 1981).

2.4.2 Enumeração de Bolores e Leveduras

Para o enriquecimento das amostras foram pesadas 25 g do material a ser analisado e adicionado 225 mL de água peptonada 0,1%. Após 1 hora foi realizada a inoculação, a qual foi feita a partir de 0,1 mL de cada 3 diluições na superfície do ágar BDA acidificado. A incubação foi realizada a 25 °C durante 3-5 dias, após este período foi realizada a contagem das colônias presentes no meio (NELSON; TOUSSON; MARASAS, 1983).

2.5 Análise antioxidante

A partir da aplicação dos conservadores nas camadas externas em massas de pizza, foi avaliada a quantificação dos fenóis durante o armazenamento e observado o comportamento antioxidante com as análises de DPPH e ABTS. A capacidade de sequestrar radical livre foi expressa como percentual de inibição de oxidação do radical e calculado conforme equação 1.

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

Onde A_{Branco} é a absorbância da solução do radical livre (ABTS ou DPPH) e A_{Extr} é a absorbância da amostra em solução. A_{Extr} foi calculada com base na diferença entre absorbância da solução de amostra em teste com o seu branco.

2.5.1 Atividade antioxidante por DPPH

Para a avaliação da atividade antioxidante foi utilizado padrão de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) na proporção p/v de (1:5000) dissolvidos em metanol sob refrigeração. A partir desta solução, foram coletados 10 mL e diluídos com metanol em 100 mL para posterior armazenamento em frasco âmbar sob refrigeração. Foi então avaliada a

atividade antioxidante adicionando em tubos de ensaio (na proporção 1:1:6, v/v) extrato, metanol e solução de DPPH na concentração de $5,2 \cdot 10^{-5}$ mol/L. Foram então testados os tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 min em espectrofotômetro a 515 nm sendo todo o experimento realizado na ausência de luz (SANTOS et al., 2011).

2.5.2 Atividade antioxidante por ABTS

O padrão de ABTS (2,2' – azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) sal diamônio) foi dissolvido em água destilada na concentração de 7mM e simultaneamente foi preparada uma solução de persulfato de potássio na concentração de 2,45 mM. Para a avaliação da atividade antioxidante foi realizada a mistura destas 2 soluções e deixados em repouso por 12-16 horas em temperatura ambiente (25 °C). Logo, foram diluídas as soluções de ABTS em etanol para alcançar a absorvância de $0,7 \pm 0,02$ lidos à 734 nm. Para a reação em tubos de ensaio, foi usado 3 mL da solução diluída para 50 µL da solução do extrato. Os testes foram mantidos na ausência de luz para evitar a degradação do radical ABTS (RUFINO et al., 2007).

2.6 Avaliação micotoxicológica

2.6.1 Determinação e quantificação das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂

Foi utilizada a metodologia modificada de Paíga et al. (2012) que consiste na pesagem de 5 g de amostra e adicionado 40 mL de acetonitrila:metanol na proporção de 1:1. A mistura foi agitada em vórtex por 3 min e adicionado 4 g de MgSO₄ e 1 g de NaCl e agitada por mais 1 min. Em seguida foi agitada por mais 1 min, centrifugada, recolhido 3 mL, evaporado em banho-maria a 80 °C e ressuspendidos em 1 mL de água milli-Q acidificada com 1% de ácido acético para posterior quantificação em cromatógrafo líquido de alta eficiência.

A quantificação das aflatoxinas foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Shimadzu. A coluna utilizada nos experimentos foi Nucleosil C18 com partículas de 3 µm e dimensões de 100 x 4,6 mm. Os solventes empregados na fase móvel foram: água milli-Q acidificada com ácido acético glacial 1%, acetonitrila e metanol na proporção 60: 8: 32 (v/v/v). As demais características do método foram vazão da fase móvel de $0,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, temperatura da coluna de 45 °C, resultando em tempo de retenção de 12,5; 15,0; 18,5 e 22,4 min para aflatoxina G₂, G₁, B₂ e B₁, respectivamente, e tempo total de corrida de 25 min. Para quantificação das aflatoxinas, o resíduo seco resultante da extração foi

ressuspensão em 500 µL de fase móvel e injetado manualmente no cromatógrafo. Para controle do equipamento e tratamento dos resultados foi utilizado o software LC Solution.

2.6.2 Determinação e quantificação de ocratoxina A

Para a determinação da ocratoxina A durante o armazenamento das massas de pizza foi utilizada a metodologia de acordo com Kupski (2014) que consiste na diluição da amostra em acetonitrila acidificada 1% em água (1:3, p/v) mais a adição de MgSO₄ e NaCl e agitação em vórtex por 10 min. Logo depois da centrifugação por 10 min a 3000 g, o sobrenadante foi avolumado a 10 mL com acetonitrila acidificada e reservado alíquotas para análise em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Shimadzu constituído por um sistema de bombas, desgaseificador da fase móvel, controlador, injetor manual com alça de amostragem de 20 µL e sistema de detecção por fluorescência. O controle do equipamento e aquisição dos dados foi feito pelo software LC Solution.

A corrida cromatográfica foi realizada à 35 °C, com vazão de 1,0 mL.min⁻¹ com detector de fluorescência (FL) nos comprimentos de onda de excitação e de emissão 333 nm e 460 nm, respectivamente. Os extratos secos foram ressuspensos em 1 mL da mistura de solventes que compõe a fase móvel (50% de Acetonitrila e 50% de água Milli Q acidificada 1% com ácido acético) e injetados no sistema cromatográfico (coluna Kromasil C18 5µm 250x4,6mm), sendo o injetor com alça de 20 µL.

2.7 Análise estatística

Todas as determinações foram realizadas em triplicatas e a significância das diferenças dos resultados foi estimada estatisticamente por ANOVA two way, a 5% de significância, seguido por teste de médias conforme Tukey utilizando o software Statistica 7.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Obtenção e aplicação dos conservadores

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi realizada no farelo de arroz fermentado nos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas conforme apresentado na Tabela 1. A partir dos resultados obtidos foi escolhido o farelo que obteve a maior quantificação.

Tabela 1 – Compostos fenólicos obtidos de diferentes tempos de fermentação no farelo de arroz.

| Tempo de fermentação (horas) | Compostos Fenólicos Totais ($\mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{biomass}}^{-1}$) |
|------------------------------|--|
| 0 | 307,05 ^c \pm 4,1 |
| 24 | 351,85 ^{b,c} \pm 21,6 |
| 48 | 439,01 ^a \pm 30,2 |
| 72 | 377,94 ^{a,b} \pm 28,9 |
| 96 | 426,61 ^a \pm 24,7 |

Médias \pm desvios padrões. Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre os tempos de fermentação pelo teste de Tukey ($\alpha < 0,05$).

Conforme a tabela 1 o farelo fermentado por 48, 72 e 96 horas não apresentaram diferença significativa, proporcionando as maiores extrações de compostos fenólicos. O farelo de 48 horas, além de despende menor tempo para o experimento, apresentou um aumento de 30% em relação ao 0 hora. Segundo Schmidt e Furlong (2012) a fermentação de farelo de arroz com o fungo *Rhizopus oryzae* demonstrou aumento em 65% do teor de compostos fenólicos após 96 horas de fermentação. De acordo com os autores, os compostos fenólicos são produzidos por clivagem de compostos complexados com lignina sendo que os mais solúveis são compartimentados no interior de vacúolos celulares, estando na forma livre ou conjugada após a síntese.

Para a aplicação dos conservadores foi utilizado o extrato dos compostos fenólicos do farelo de arroz fermentado no tempo de 48 horas e elaborado também a solução de propionato de cálcio, as duas soluções em concentrações de $735 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Após a aplicação dos conservadores, as massas de pizzas absorveram $294 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ das soluções preparadas.

Durante o armazenamento de massas de pizzas foi verificado a eficiência de conservantes naturais e químicos comparando aspectos microbiológicos como glicosamina e enumeração de bolores e leveduras conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2 – Análises de glicosamina e microbiológicas de massas de pizza empregando diferentes conservadores e armazenados durante 21 dias.

| | Dias | Conservadores | | |
|--|------|---------------------|----------------------|----------------------|
| | | CFFAF | Propionato | Controle |
| Glicosamina ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) | 1° | 2,95 ^{c-A} | 3,14 ^{b-A} | 3,13 ^{c-A} |
| | 7° | 2,99 ^{c-C} | 3,26 ^{b-B} | 5,01 ^{b-A} |
| | 14° | 3,36 ^{b-B} | 3,29 ^{b-B} | 5,49 ^{a-A} |
| | 21° | 3,54 ^{a-C} | 4,89 ^{a-B} | 5,47 ^{a-A} |
| Enumeração de bolores e leveduras (UFC.mL ⁻¹) | 1° | ND | <10 | 2,25.10 ³ |
| | 7° | ND | 4,43.10 ² | Inc |
| | 14° | ND | Inc | Inc |
| | 21° | <10 | Inc | Inc |

CFFAF = Compostos fenólicos de farelo de arroz fermentado. ND – Não detectável, Inc – Números de colônias incontáveis.

Letras iguais e maiúsculas na mesma linha e letras iguais e minúsculas na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($\alpha < 0,05$).

Conforme a Tabela 2, o conservante composto por CFFAF não apresentou diferença significativa durante o tempo de armazenamento para a determinação de glicosamina, diferentemente dos conservadores propionato de cálcio e controle, que apresentaram no 21° dia contaminações significativas. Além disso, na enumeração de bolores e leveduras, o conservante de CFFAF não detectou a presença de micro-organismos até 14° dia. Os tratamentos controle e propionato ao 7° e 14° dia, respectivamente, já apresentaram um número incontáveis de colônias. Por isso, os CFFAF mostrou promissora barreira para a contaminação fúngica e este resultado pode ser confirmado nas Figuras 1 e 2.

Figura 1- Massas de pizzas tratadas com conservador de CFFAF (a), propionato de cálcio (b) e controle (c) armazenados por 14 dias.

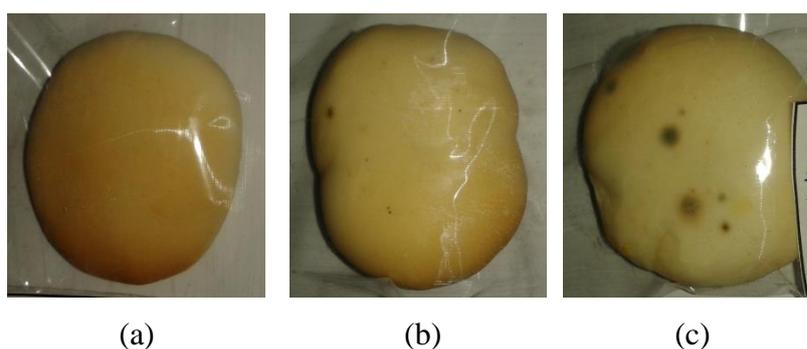
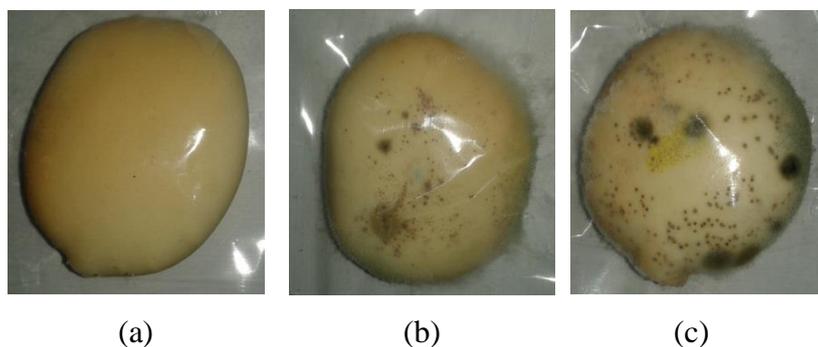


Figura 2- Massas de pizzas tratadas com conservador de CFFAF (a), propionato de cálcio (b) e controle (c) armazenados por 21 dias.

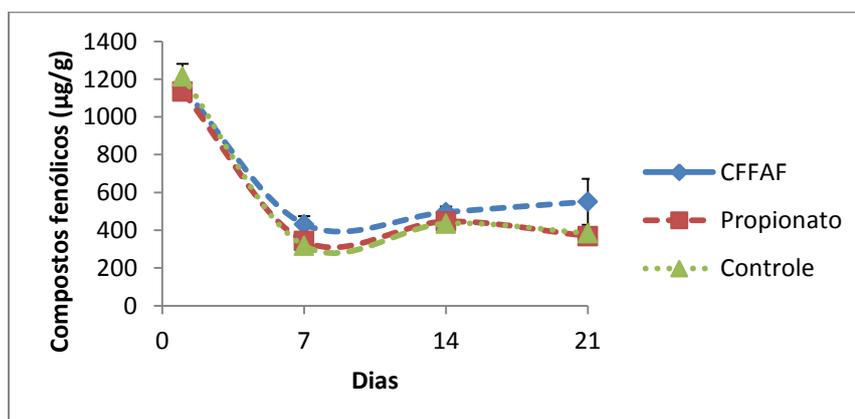


Estes resultados estão de acordo com Christ-Ribeiro et al. (2011) confirmando a eficiência dos compostos fenólicos do farelo de arroz fermentado por *Rhizopus oryzae* na preservação de massas de pizza. Os resultados podem ser explicados devido à presença do ácido ferúlico, um composto majoritário no farelo de arroz fermentado com potencial para inibir o crescimento bacteriano e fúngico devido as posições (para e meta) dos seus grupos OH (OCH₃) sobre o anel de benzeno. Também é um importante antioxidante e atua como inibidor de enzimas fúngicas e pode ser aplicado como um conservante em produtos alimentícios (ALVES et al., 2013, SCHMIDT et al., 2014, LEMOS et al., 2014).

3.2 Avaliação Antioxidante

Para uma melhor compreensão na relação de atividade antioxidante e a conservação dos tratamentos aplicados em massas de pizzas, foram extraídos os compostos fenólicos, quantificados e os resultados estão comparados na Figura 3.

Figura 3 – Quantificação dos compostos fenólicos dos extratos de massas de pizza empregando diferentes conservadores e armazenados durante 21 dias.



De acordo com a Figura 3, podemos observar que a quantificação dos compostos fenólicos para os três tratamentos apresentou comportamento similar, partindo de um alto teor de compostos fenólicos e diminuindo ao 7º dia. Apesar deste desempenho, pode-se observar que o tratamento realizado com CFFAF apresenta teores acima dos demais, isso pode ser explicado pela camada adicionada de compostos fenólicos do farelo de arroz fermentado como conservador. Após esta etapa foi avaliado a percentagem de inibição dos radicais ABTS e DPPH conforme demonstrado nas Figuras 4 e 5, respectivamente.

Figura 4 - Percentagem de inibição dos radicais ABTS por extratos de massas de pizza empregando diferentes conservadores e armazenados durante 21 dias.

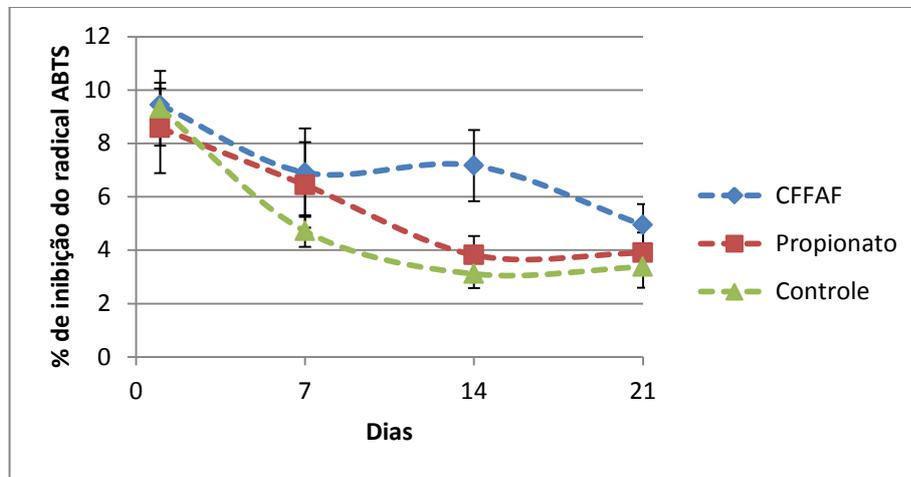
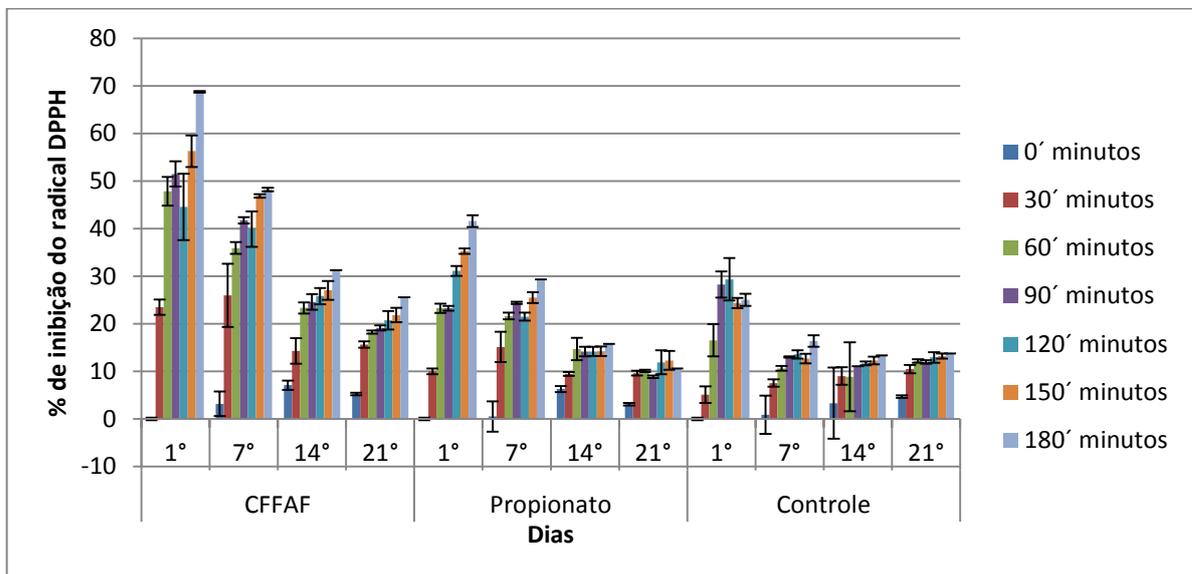


Figura 5 - Percentagem de inibição dos radicais DPPH por extratos de massas de pizza empregando diferentes conservadores e armazenados durante 21 dias.



Conforme a Figura 4 pode-se verificar que o conservador propionato, assim como os CFFAF, apresentou valores semelhantes ao 7º dia de armazenamento, diferentemente do controle. As pizzas tratadas com o conservador CFFAF obtiveram os maiores valores destacando-se aos 14 dias de armazenamento, que apresentou inibição 100% maior quando comparado aos demais tratamentos.

Na Figura 5 observa-se desempenho semelhante, sendo que o tratamento CFFAF apresentou inibições superiores nos tempos testados e durante o armazenamento, atingindo a máxima inibição de, aproximadamente, 70% dos radicais de DPPH no 1º dia de armazenamento. Estes resultados, principalmente do conservador CFFAF, explicam a inibição fúngica já que os compostos fenólicos desempenham um papel importante na atividade antioxidante influenciando na preservação das massas de pizza. Isto ocorre juntamente com o núcleo aromático e um grupo OH fenólico reativo, formando pontes de hidrogênio com os sítios ativos de enzimas microbianas alvo inibindo a produção de energia e a síntese de componentes estruturais (VELLUTI et al., 2003, OLIVEIRA et al., 2007).

Em geral, a eficácia da atividade antioxidante de um composto fenólico aumenta a partir da ação de grupos substituintes no anel fenólico, que aumentam a capacidade de doar hidrogênio e/ou aumentam a estabilidade do radical livre sequestrado (PRAKASH et al., 2012). Por isso, estes resultados de CFFAF apresentados, principalmente na Figura 5, indicam funcionalidade comparada com o conservador convencional utilizado na indústria de panificação (propionato de cálcio) já que mostraram inibições dos radicais superiores aos outros tratamentos.

Schmidt et al. (2014) testaram os compostos fenólicos do farelo de arroz fermentado por *Rhizopus oryzae* e verificaram aumento na inibição do radical DPPH e das enzimas peroxidase e polifenoloxidase. De acordo com Oliveira et al. (2012) o extrato metanólico de compostos fenólicos produzidos a partir da biomassa de farelo de arroz fermentado por *Rhizopus oryzae* de 96 horas, sequestrou 50% do radical livre em 15 minutos.

3.3 Determinação de Micotoxinas

Após o armazenamento das massas de pizza com os conservadores aplicados foram determinados e quantificadas a ocratoxina A e as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ presentes durante o 1º, 7º, 14º e 21º dias de estocagem. Estes resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores de ocratoxina A e aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em massas de pizzas armazenadas com diferentes conservadores.

| | Dias | Conservadores | | |
|---|------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| | | CFFAF | Propionato | Controle |
| OTA (ng.g ⁻¹) | 1° | 12,34 ^{a-A} | 9,25 ^{c-B} | 12,96 ^{b-A} |
| | 7° | 9,90 ^{b-C} | 12,17 ^{a-B} | 14,76 ^{b-A} |
| | 14° | 8,11 ^{c-B} | 8,29 ^{d-B} | 19,92 ^{a-A} |
| | 21° | 7,47 ^{d-C} | 10,63 ^{b-B} | 20,90 ^{a-A} |
| Aflatoxina G ₂ (ng.g ⁻¹) | 1° | 25,32 ^{a-A} | 27,6 ^{a-A} | 28,56 ^{b-A} |
| | 7° | 24 ^{a,b-B} | 24,6 ^{b-B} | 29,76 ^{a,b-A} |
| | 14° | 22,8 ^{b-C} | 24,72 ^{b-B} | 30,48 ^{a-A} |
| | 21° | 20,16 ^{c-B} | 20,4 ^{c-B} | 26,28 ^{c-A} |
| Aflatoxina G ₁ (ng.g ⁻¹) | 1° | ND | ND | ND |
| | 7° | ND | ND | ND |
| | 14° | ND | 25,92 ^{b-A} | 16,32 ^{b-B} |
| | 21° | ND | 107,16 ^{a-B} | 262,08 ^{a-A} |
| Aflatoxina B ₂ (ng.g ⁻¹) | 1° | 0,48 ^{c-A} | 0,48 ^{b-A} | 0,48 ^{c-A} |
| | 7° | 4,74 ^{a-A} | 4,08 ^{a,b-A} | 4,8 ^{a-A} |
| | 14° | 3,24 ^{b-A} | 0,48 ^{b-B} | 3,84 ^{b-A} |
| | 21° | ND | ND | 0,24 ^{c-A} |
| Aflatoxina B ₁ (ng.g ⁻¹) | 1° | 148,89 ^{c-C} | 425,16 ^{b-B} | 628,92 ^{c-A} |
| | 7° | 893,88 ^{a-C} | 1015,2 ^{a-B} | 2287,2 ^{a-A} |
| | 14° | 618,24 ^{b-B} | 515,48 ^{b-B} | 1833,96 ^{b-A} |
| | 21° | ND | 11,76 ^{c-B} | 23,52 ^{d-A} |

CFFAF = Compostos fenólicos de farelo de arroz fermentado. ND – Não detectável.

Letras iguais e maiúsculas na mesma linha e letras iguais e minúsculas na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($\alpha < 0,05$).

De acordo com a Tabela 3, pode-se observar que, com exceção da aflatoxina G₁, todas as micotoxinas apresentaram contaminações já ao 1° dia para todos os tratamentos indicando contaminações na farinha de trigo, matéria prima aplicada para a produção das massas de pizzas. Fato esse já averiguado por Weidenbîrner et al. (2000) e Cabañas et al. (2008) onde afirmam que metabólitos de fungos tóxicos podem ser encontrados em produtos

alimentares a base de cereais, do qual a farinha contaminada é um ingrediente para os produtos de panificação.

A contaminação de ocratoxina A aumentou com o decorrer dos dias de estocagem das pizzas com o conservador de propionato de cálcio e o controle alcançando teores de 10,63 e 20,9 ng.g^{-1} de amostra, respectivamente. Apesar deste aumento durante o armazenamento, o conservador propionato de cálcio minimizou a contaminação de OTA, que comparado com o controle, foi eficaz na inibição de 33,3% desta micotoxina.

Apesar de escassa bibliografia sobre a relação entre a concentração de compostos fenólicos e conservantes na inibição da produção de OTA, de acordo com Marin et al. (2002) e Arroyo; Aldred; Magan (2005) os conservantes utilizados na panificação como o sorbato de potássio ou o propionato de cálcio são capazes de prevenir a contaminação por OTA. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados neste trabalho que mostra inibição da produção de OTA pelo propionato de cálcio. Conforme Palumbo et al., (2007) uma nova estratégia de estudo é o uso de antioxidantes como os compostos fenólicos ácido vanílico ou ácido 4-hidroxibenzóico que afetaria o crescimento fúngico e a síntese de OTA.

O comportamento diferenciado foi observado quando aplicado o conservador CFFAF, variando ou reduzindo os teores de OTA em 1,6 vezes quando comparado com a contaminação inicial. No 21º dia de estocagem este conservador demonstrou uma contaminação de 7,47 ng.g^{-1} , apontando assim efeito inibidor na produção desta micotoxina, apresentando diferenças entre 64,25 e 29,72% em relação ao controle e o conservador propionato de cálcio, respectivamente. Estes resultados relatam que houve redução de OTA nas massas de pizzas onde os conservantes de CFFAF foram aplicados. Com as atividades antifúngicas e antioxidantes que a aplicação do CFFAF ocasionou nas massas de pizzas, pode haver correlação com a redução de OTA para esse tratamento.

O conservante CFFAF obteve os mesmos resultados para as aflatoxinas, sendo que para G_1 não foi encontrada contaminação em nenhum dos dias do armazenamento. Para aflatoxina G_2 houve uma redução de 20,3% para sua contaminação inicial e para as aflatoxinas B_2 e B_1 ao 7º dia ocorreu um aumento da contaminação e ao 21º dia de armazenamento essas micotoxinas não foram detectadas.

Esta conduta do conservador de CFFAF na inibição da síntese das micotoxinas pode ser atribuída pela diminuição do estresse oxidativo, que é um pré-requisito para a produção de aflatoxinas, além do aumento da peroxidação lipídica e a formação de radicais livres (SOUZA et al., 2012).

Além disso, o efeito inibidor de aflatoxina pelos compostos fenólicos é relatado por Kim et al. (2006), onde a inibição de crescimento de *Aspergillus flavus* pelo ácidos fenólicos salicílico, timol, vanílico, vanilina e cinâmico é realizada através da segmentação do sistema de defesa do estresse oxidativo mitocondrial. As mitocôndrias são responsáveis pelo fornecimento de acetil- CoA, o principal precursor para a biossíntese de alguns fungos, a interrupção da respiração da cadeia mitocondrial pode explicar, em parte, os efeitos inibitórios dos antifúngicos fenólicos sobre a produção de aflatoxinas (PRAKASH et al., 2012).

O conservante de propionato de cálcio ocasionou a inibição das aflatoxinas G₂ e B₂, produção de G₁ em 26, 100 e 107%, respectivamente, e a redução da B₁ em 97% comparando com seus valores iniciais. O controle apresentou teores altos de aflatoxina G₂ durante todo o período de armazenamento, aumento da produção das aflatoxinas G₁ em 93,7% a partir do 14º dia de armazenamento e degradação das aflatoxinas B₂ e B₁ em 50 e 96,2%, respectivamente.

Estes teores de micotoxinas encontrados inicialmente nas massas de pizzas e durante o armazenamento, apesar de estarem abaixo dos limites da legislação atualmente em vigor (ANVISA, 2011), indicam um alerta para os alimentos armazenados e os tratados com conservadores químicos. Neste estudo, apesar das massas de pizzas não apresentarem contaminação microbiológica inicialmente em todos os tratamentos, as micotoxinas já eram detectáveis, indicando uma ameaça invisível. Além disso, produtos de panificação em geral, são muito presentes na alimentação humana, despertando cautela quanto aos níveis apresentados, uma vez que com a ingestão de micotoxinas tendem a acumular no organismo, causando uma série de transtornos, desde ataques ao fígado a alguns tipos de câncer (FIB, 2008).

4. CONCLUSÃO

O conservante de compostos fenólicos obtidos a partir do farelo de arroz fermentado (CFFAF) mostram que a substituição dos conservantes tradicionais por estes são promissores e inovadores, uma vez que a aplicação deles em massas de pizza foi eficaz como inibidor da contaminação fúngica e micotoxicológica, além de apresentar atividade antioxidante durante 21 dias de armazenamento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of AOAC International**. 14th ed. Washington, p.1141, 2000.

AIDOO, K.E.; HENDRY, R.; WOOD, B.J. Estimation of Fungal Growth in a Solid State Fermentation System. **Appl Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 6-9, 1981.

ALVES, M. J.; FERREIRA, I. C. F. R.; FROUFE, H. J. C.; ABREU, R. M. V.; MARTINS, A.; PINTADO, M. Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. **Journal of Applied Microbiology**. 115:2, 346–357, 2013.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC N° 7, de 18 de fevereiro de 2011. Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União** – Seção 1, n. 37, ISSN 1677-7042, 2011.

ARROYO, M.; ALDRED, D.; MAGAN, N. Environmental factors and weak organic acid interactions have differential effects on control of growth and ochratoxin A production by *Penicillium verrucosum* isolates in bread. **International Journal of Food Microbiology**, 98, 223–231, 2005.

CABAÑAS, R.; BRAGULAT, M.R.; ABARCA, M.L.; CASTELLA, G.; CABAÑES, F.J. Occurrence of *Penicillium verrucosum* in retail wheat flours from the Spanish market. **Food Microbiology**, 25, 642– 647, 2008.

CHRIST-RIBEIRO, A.; BRETANHA, C. C.; LUZ, G. G.; SOUZA, M. M. DE; BADIALE-FURLONG, E. Aplicação de compostos antifúngicos naturais na conservação de produto de panificação. **Projeto de Graduação em engenharia de alimentos**, 2011.

CIZEIKIENE, D.; JUODEIKIENE, G.; PASKEVICIUS, A.; BARTKIENE, E. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. **Food Control**, 31, 539-545, 2013.

FIB – FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Segurança Alimentar**. N° 4, 2008.

FREIRE, F. DAS C. O. A deterioração fúngica de produtos de panificação no Brasil. **Comunicado Técnico da Embrapa Agroindústria Tropical**, 174, 1ª edição: on-line. <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/907492>, 2011.

GIANNOU, V.K.; KESSOGLOU, V.; TZIA C. Quality and safety characteristics of bread made from frozen dough. **Trends in Food and Technology**, v.14, p. 199-108, 2003.

GONZÁLEZ-ROMPINELLI, E. M.; RODRÍGUEZ-BENCOMO, J. J.; GARCÍA-RUIZ, A.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J.; BARTOLOMÉ, B.; MORENO-ARRIBAS, M. V. A winery-scale trial of the use of antimicrobial plant phenolic extracts as preservatives during wine ageing in barrels. **Food Control**, 33, 2, 440-447, 2013.

HUTTON, D. La seguridad alimentaria y el consumidor en la Unión Europea. In: La seguridad alimentar del productor al consumidor. **Madrid: Mundi Prensa**, p.107-118, 2003.

IAMANAKA, B. T.; OLIVEIRA, I. S.; TANIWAKI, M. H. Micotoxinas em alimentos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, 7, p.138-161, 2010.

KIM, J. H.; MAHONEY, N.; CHAN, K. L.; MOLYNEUX, R.; CAMPBELL, B. C. Controlling food-contaminating fungi by targeting antioxidant stress-response system with natural phenolic compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 70, 735–739, 2006.

KUPSKI, L. Biodegradação enzimática de ocratoxina A. **Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos)** – Universidade Federal do Rio Grande – Rio Grande, 2014.

LEISTNER, L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. **International Journal of Food Microbiology**, 55, 181–186, 2000.

LEMOES, M.; BORGES, A.; TEODÓSIO, J.; ARAÚJO, P.; MERGULHÃO, F.; MELO, L.; SIMÕES, M. The effects of ferulic and salicylic acids on *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* single- and dual-species biofilms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 86, 42-51, 2014.

MARÍN, S.; GUYNOT, M. E.; NEIRA, P.; BERNADÓ, M.; SANCHÍS, V.; RAMOS, A. J. Risk assessment of the use of sub-optimal levels of weak acid preservatives in the control of mold growth on bakery products. **International Journal of Food Microbiology**, 79, 203–211, 2002.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic and reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, 31:426-8, 1959.

NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. *Fusarium* species-an illustrated manual for identification. Pennsylvania, **Pennsylvania State University Press**, 1983.

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

OLIVEIRA, M. S.; KUPSKI, L.; FEDDERN, V.; CIPOLATTI, E. P.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L. A. de. Physico-chemical characterization of fermented rice bran biomass. **Food Science and Technology**, p. 7-11, 2009.

OLIVEIRA, M. dos S.; CIPOLATTI, E. P.; FURLONG, E. B.; SOARES, L. de S. Compostos fenólicos e atividade antioxidante em farelo de arroz (*Oryza sativa*) fermentado. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** [online], vol.32, n.3, pp. 531-537, 2012.

PAÍGA, P.; MORAIS, S.; OLIVA-TELES, T.; CORREIA, M.; DELERUE-MATOS, C.; DUARTE, S. C.; PENA, A.; LINO, C. M. Extraction of ochratoxin A in bread samples by the QuEChERS methodology. **Food Chemistry** 135, 2522–2528, 2012.

PALUMBO, J. D.; O'KEEFFE, T. L.; MAHONEY, N. E. Inhibition of ochratoxin A production and growth of *Aspergillus* species by phenolic antioxidant compounds. **Mycopathologia**, 164, 241–24, 2007.

PARDO, G.; ZUFÍA, J. Life cycle assessment of food-preservation technologies. **Journal of Cleaner Production**, 28, 198-207, 2012.

PRAKASH, B.; SINGH, P.; KEDIA, A.; DUBEY, N. K. Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and in vivo efficacy in food system. **Food Research International**, 49, 1, 201-208, 2012.

RYAN, L. A. M.; ZANNINI, E.; BELLO, F. D.; PAWLOWSKA, A.; KOEHLER, P.; ARENDT, E. K. *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280 as a novel food-grade antifungal agent for bakery products. **International Journal of Food Microbiology**, 146, 276-283, 2011.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS. **Comunicado Técnico 128 – Embrapa**. ISSN 1679-6535, 2007.

SANTOS, S. N.; CASTANHA, R. F.; HABER, L. L.; MARQUES, M. O. M.; SCRAMIM, S.; MELO, I. S. Determinação quantitativa da atividade antioxidante de extratos brutos de microrganismos pelo método de captura de radical livre DPPH. **Comunicado Técnico 50 – Embrapa**. ISSN 1516-8638, 2011.

SCHMIDT, C. G.; FURLONG, E. B. Effect of particle size and ammonium sulfate concentration on rice bran fermentation with the fungus *Rhizopus oryzae*. *Bioresource Technology*, 123, 36-41, 2012.

SCHMIDT, C. G.; GONÇALVES, L. M.; PRIETTO, L.; HACKBART, H. S.; FURLONG, E. B. Antioxidant activity and enzyme inhibition of phenolic acids from fermented rice bran with fungus *Rizhopus oryzae*. **Food Chemistry**, 146, 371-377, 2014.

SOUZA, M. M.; RECARTE, M. R.; ROCHA, M.; CIPOLATTI, E. P.; FURLONG, E. B. Estudo das condições de extração de compostos fenólicos de cebola (*Allium cepa* L.). **Revista do Instituto Adolf Lutz**, v. 68, n.2, p. 192-200, 2009.

SOUZA, M. M. de; OLIVEIRA, M. dos S.; ROCHA, M. da; FURLONG, E. B. Avaliação da atividade antifúngica de extratos fenólicos de cebola, farelo de arroz e microalga *Chlorella pyrenoidosa*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 30, 3, pp 680-685, 2010.

SOUZA, M. M. de; ROCHA, M. da; OLIVEIRA, M. dos S.; FURLONG, E. B. Avaliação das atividades antifúngica e antimicotóxica de extratos fenólicos de farelo de arroz. **Rev Inst Adolfo Lutz.**; 71(3):437-41, 2012.

SUHR, K. I.; NIELSEN, P. V. Effect of weak acid preservatives on growth of bakery product spoilage fungi at different water activities and pH values. **International Journal of Food Microbiology**, 95, 67- 78, 2004.

VAQUERO, M. J. R.; SERRAVALLE, L. R. T.; NADRA, M. C M. DE; SAAD, A. M. S. DE. Antioxidant capacity and antibacterial activity of phenolic compounds from argentinean herbs infusions. **Food Control**, Volume 21, Issue 5, Pages 779-785, 2010.

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

WEIDENBÄRNER, M.; WIECZOREK, C.; APPEL, S.; KUNZ, B. Whole wheat and white wheat flour - the mycobiota and potential mycotoxins. **Food Microbiology**, 17,103-107, 2000.

CAPÍTULO IV
CONCLUSÃO GERAL

5. CONCLUSÃO GERAL

Contudo, os compostos fenólicos de farelo de arroz fermentado por *Rhizopus oryzae* mostraram-se promissores em comparação aos extraídos da microalga *Spirulina* sp. LEB-18 nos testes de inibição da linhagem celular NIH/3T3, antifúngico e antimicotoxigênico.

Além disso, os compostos fenólicos extraídos do farelo de arroz por *Rhizopus oryzae*, quando aplicados em massas de pizza com a função de conservadores foram eficientes inibindo a contaminação fúngica e minimizando a produção de micotoxinas, além de proporcionar funcionalidade.

CAPÍTULO V
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AMENDOLA D.; DE FAVERI D. M.; SPIGNO G. Grape marc phenolics: Extraction kinetics, quality and stability of extracts. **Journal of Food Engineering**, vol. 97, n. 3, p. 384–392, 2010.

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

ANVISA (2010) – **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução – RDC N° 7, de 18 de fevereiro de 2011. Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial da União – Seção 1, n. 37, ISSN 1677-7042, 2011.

AOE, S.; ODA, T.; TATSUMI, K.; YAMAUCHI, M.; AYANO, Y. Extraction of soluble dietary fibers from defatted rice bran. **Cereal Chemistry**, v.70, n.4, p.423-425, 1993.

ARAÚJO, J. M. A.; **Química de Alimentos: teoria e prática**; 5. ed. atual. ampl., Viçosa, MG. Ed. UFV; 2011.

AVILA, L. A. de; MARCHEZAN, E; WALTER, M. **Arroz: composição e características nutricionais**. Ciência Rural, Santa Maria, v.38, n.4, p.1184-1192, jul, 2008.

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.

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

BIERHALS, V. S.; MACHADO. V. G.; ECHEVENGUÁ, W. O., COSTA, J. A. V.; FURLONG, E. B. Compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e antifúngica de multimisturas enriquecidas com a microalga *Spirulina platensis*. **Ver. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, 68(1): 42-8, 2009.

BORZANI, W.; AQUARONE, E.; LIMA, U.;SCHMIDELL. **Biología Industrial**, v. 2, p.247-56, 2001.

BOTRE, D. A.; SOARES, N. F. F.; ESPITIA, P. J. P.; SOUSA, S.; RENHE, I.R.T. Avaliação de filme incorporado com óleo essencial de orégano para conservação de Pizza pronta. **Rev. Ceres, Viçosa**, v.57, n.3, p. 283-291, 2010.

BRASIL. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos** - Lista dos Novos Ingredientes aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária em maio de 2009.

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

CHRIST-RIBEIRO, A. C.; BRETANHA, C. C.; LUZ, G. G.; SOUZA, M. M.; BADIALE-FURLONG. Aplicação de compostos antifúngicos naturais na conservação de produto de panificação. **Projeto de Graduação em engenharia de alimentos**. 2011.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; REICHERT, C.; COSTA, J. A. V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 98, n. 7, p. 1489-1493, 2007.

DOURADO, R. S. Isolamento de compostos secundários em extratos de caules e folhas de *Hypericum cordatum* (Vell. Conc.) N. Robson (Clusiaceae). **Dissertação. (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente)** - Área de Plantas Vasculares em Análises Ambientais. São Paulo, 2006.

FEDDERN, V.; FURLONG, E. B.; SOARES, L. A. S. Efeitos da fermentação nas propriedades físico-químicas e nutricionais do farelo de arroz. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, Campinas, v.27, n4, p.800- 804, 2007.

FREIRE, F. C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal. **Embrapa Agroindústria Tropical**. Documentos, ISSN 1677-1915, 110, 48 p., 2007.

FREIRE, F. C. O. A Deterioração Fúngica de Produtos de Panificação no Brasil. **Comunicado Técnico/ Embrapa Agroindústria Tropical**. ISSN 1679-6535, 174, 5 p., 2011.

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

GIANNOU, V.K.; KESSOGLOU, V.; TZIA C. Quality and safety characteristics of bread made from frozen dough. **Trends in Food and Technology**, v.14, p. 199-108, 2003.

GRIFFIN, DAVID H. **Fungal Physiology**. 2° edition, 458 pág., 1994.

HEBEDA, R. E.; ZOBEL H. F. **Baked goods freshness, technology, evaluation, and inhibition of staling**. Editorial Board, New York, p. 137-140, 1996.

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.

IRGA - **Instituto Rio Grandense do Arroz**. Setor Produtivo: Plantio do arroz safra 2010/11. Disponível em: www.irga.rs.gov.br. Acessado em: maio de 2011.

JOSAPAR- Joaquim Oliveira S/A Participações. Produzindo qualidade desde 1922. Disponível em <http://josapar.com.br/>. Acesso em fev, 2014.

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

KRISHNASWAMY, K.; ORSAT, V.; GARIÉPY, Y.; THANGAVEL, K. Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Antioxidants from Grape Seeds (*Vitis vinifera*). **Food Bioprocess Technol**, DOI 10.1007/s11947-012-0800-2, 2012.

KOLEVA, I.I.; VAN-BEEK, T.A.; LINSSEN, J.P.; GROOT, A.; EVSTATIEVA, L.N.. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**, 13, 8-17, 2002.

LABORATÓRIO DE ENGENHARIA BIOQUÍMICA (LEB) - FURG. Encontrado em file:///C:/Users/Cliente/Downloads/Produ%C3%A7%C3%A3o%20de%20Microalgas%20%20a%20Partir%20de%20CO2%20Gerado%20em%20Termel%C3%A9rica.pdf. Acesso em fev 2014.

LEMO, M. R. J.; SOARES, L. A. S. Farelo de arroz: um subproduto em estudo. **Revista Óleos & Grãos**, p. 40-47, 1999.

MALEKIAN, F. et al. Lipase and lipoxygenase activity, functionality, and nutrient losses in rice bran during storage. **Bulletin of the Louisiana Agricultural Experiment Station**, Baton Rouge, n. 870, p. 1-69, 2000.

MICHEREFF, S. J.; **Epidemiologia de doenças de plantas**. Recife, UFRPE, Set.. Disponível em site www.ufrpe.br/fitopatologia, 2006.

NÓBREGA, D. G. G.; FREITAS, W. C.; LIMA, A. W. O. e SOUSA, C. P. Parâmetros Físicos e Microbiológicos de Massa Congelada do Tipo Pizza Pronta Comercializada em João Pessoa. **Tese de Mestrado, ciência e tecnologia de alimentos** - UFPB/J.P., 2003.

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

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes Vegetais Naturais de Antioxidantes. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 3, 689-702, 2009a.

OLIVEIRA, M. S.; KUPSKI, L.; FEDDERN, V.; CIPOLATTI, E. P.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L. A. de. Physico-chemical characterization of fermented rice bran biomass. **Food Science and Technology**, p. 7-11, 2009.

OLIVEIRA M.; VITÓRIO D.; AMANAJÁS P.: "Elasticidade-preço e renda da demanda de pão na região metropolitana de Belém, 2012", em **Observatorio de la Economía Latinoamericana**, N. 167, 2012. Texto completo em <http://www.eumed.net/cursecon/ecolat/br/>.

OLIVEIRA, A. M. C. Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e atividade antifúngica de pimentas do gênero *capsicum spp*. **Tese de mestrado em alimentos e nutrição**. Universidade Federal do Piauí – UFPI, 2011.

OLIVEIRA, C. A. DE; CAMPOS, A. A. DE O.; RIBEIRO, S. M. R.; OLIVEIRA, W. DE C.; NASCIMENTO, A. G. DO. Potencial nutricional, funcional e terapêutico da cianobactéria *spirulina*. **RASBRAN - Revista da Associação Brasileira de Nutrição**. São Paulo, SP, Ano 5, n. 1, p. 52-59, Jan-Jun. 2013.

ORTIZ, D. W. Processamento de pizzas: perdas no processo, reprocesso e descarte de massa. **Monografia em engenharia de alimentos**. Instituto Federal de Educação, ciência e tecnologia. 2011.

PAÍGA, P.; MORAIS, S.; OLIVA-TELES, T.; CORREIA, M.; DELERUE-MATOS, C.; DUARTE, S. C.; PENA, A.; LINO, C. M. Extraction of ochratoxin A in bread samples by the QuEChERS methodology. **Food Chemistry** 135, 2522–2528, 2012.

PARISI, A. S.; YOUNES, S.; REINEHR, C. O.; COLLA, L. M. Avaliação da atividade antibacteriana da microalga *Spirulina platensis*. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, 30(3):297-301. ISSN 1808-4532, 2009.

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

PESTANA, V. R.; MENDONÇA, C. R. B.; ZAMBIAZI, R. C. Farelo de arroz: características, benefícios à saúde e aplicações. **Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba v. 26, n. 1, jan./jun. 2008.

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

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais. **Comunicado Técnico on line**. ISSN 1679-6535, Fortaleza, CE, 2005.

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

POLÔNIO, M. L. T.; PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. **Cadernos de Saúde Pública**, 25(8), 1653-1666, 2009.

POTRICKOS, R.; KLETCKE, V.; LOCATELLI, C.; ZANCANARO, V.; SANTOS, P. Determinação de fenóis totais em infusões aquosas de chá verde (*Camelia sinensis*) e de erva mate (*Ilex paraguariensis*) preparada na forma de chimarrão. **RIES**, ISSN 2238-832X, Caçador, v.2, n.1 (Suplemento), p. 27-38, 2013.

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

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

RE, R.; N. PELLEGRINI, A.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, M.; YANG; C. RICE-EVANS. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorizing assay. **Free Radical Biol. Med.**, 26: 1231-1237, 1999.

RODRIGUES, T. T. Revisão bibliográfica da utilização de bacteriocinas como conservantes alimentícios na última década. **Monografia. Bacharel em Farmácia**. Chapecó-SC, 2010.

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

ROGINSKY, V; LISSI, EA. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 2005.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial**. Ed. Edgard Blucher Ltda, São Paulo, v. 2, p. 247-248, 2001.

SCHMIDT, C. G; GONÇALVES, L. M.; PRIETTO, L.; HACKBART, H. S.; FURLONG, E. B. Antioxidant activity and enzyme inhibition of phenolic acids from fermented rice bran with fungus *Rizhopus oryzae*. **Food Chemistry**, 146, 371–377, 2014.

SCHIRMER, M.; HUSSEIN, W.B.; JEKLE, M.; HUSSEIN, M.A.; BECKER, T. Impact of air humidity in industrial heating processes on selected quality attributes of bread rolls. **Journal of Food Engineering** 105, 647–655, 2011.

SILVEIRA, C. M.; FURLONG, E. B. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 27(4): 805-811, out.-dez. 2007.

SINGHANIA, R.R., PATEL, A.K., SOCCOL, C.R., PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, 44, 13–18, 2009.

SOUZA, M. M.; OLIVEIRA, M. S.; ROCHA, M.; FURLONG, E. B. Avaliação da atividade antifúngica de extratos fenólicos de cebola, farelo de arroz e microalga *Chlorella phyrenoidosa*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.30, n.3, p. 680-685, 2010.

SOUZA, M. M.; PRIETTO, L.; RIBEIRO, A. C.; SOUZA, T. D.; BADIÁLE-FURLONG, E. Assessment of the antifungal activity of *Spirulina platensis* phenolic extract against *Aspergillus flavus*. **Ciênc. agrotec.** vol.35 n.6 Lavras Nov./Dec. 2011.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA G.; COSTA, J. N. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde** 2012;14(4):263-9.

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

TASSOU, C.C.; DROSINOS, E.H.; NYCHAS, G.J.E. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 and 10°C **Journal of Applied Bacteriology** v. 78, p. 593-600, 1995.

TOLEDO, ANDRÉA D'AGOSTO et al. O uso de conservadores em produtos alimentícios. **Monografia (Graduação em Nutrição)** - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

VICHAPONG J.; SOOKSERM M.; SRIJESDARUK V.; SWATSITANG P.; SRIJARANAI, S. High performance liquid chromatographic analysis of phenolic compounds and their antioxidant activities in rice varieties. **Food Science and Technology**, V. 43; p. 1325 – 1330; 2010.

VITORINO, O. C. L. Micotoxinas na alimentação e na saúde animal e humano. **Tese de Mestrado em Engenharia Zootécnica**. Universidade dos Açores. Angra do Heroísmo, 2011.

VON DER, W. D.; DILLON, J.C. Falquet J. Malnutrition: a silent massacre. Geneve: **Antenna Technology**; 2000. 13p.

WANG, S. H.; OLIVEIRA, M. F.; COSTA, P. S.; ASCHERI, J. L. R.; ROSA, A. G. Farinhas de trigo e soja pré-cozidas por extrusão para massas de pizza. **Pesq. agropec. bras.**, v.40, n.4, p.389-395, 2005.

WOJDYLO, A.; OSZMIANSKI, J.; CZEMERYYS, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, 105, 940-949 (2007).

YOSHIKAWA, K.; SAITO, S.; SAKURAGAWA, A. Simultaneous analysis of acidulants and preservatives in food samples by using capillary zone electrophoresis with indirect UV detection. **Food Chemistry**, Volume 127, Issue 3, 1, P 1385-1390, 2011.