

Avaliação das atividades antifúngica e antimicotoxina de extratos fenólicos de farelo de arroz

Evaluation of antifungal and antimycotoxin activities of phenolic extracts from rice bran

RIALA6/1487

Michele Moraes de SOUZA^{1*}, Meritaine da ROCHA², Melissa dos Santos OLIVEIRA³, Eliana BADIALE-FURLONG¹

*Endereço para correspondência: ¹Escola de Química e Alimentos (EQA), Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Av. Engenheiro Alfredo Huch, 475, Campus Cidade, Rio Grande, RS, CEP: 96201-900. E-mail: michele.moraesdesouza@gmail.com

²Bolsita do CNPq, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos com área de concentração em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS

³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Farroupilha – Campus Santo Augusto, Santo Augusto, RS
Trabalho financiado pelo CNPq e Capes, parte da tese de doutorado de Michele Moraes de Souza, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos – Ano de defesa: 2012

Recebido: 07.11.2011 – Aceito para publicação: 30.08.2012

RESUMO

Neste trabalho, foram feitas associações dos níveis de compostos fenólicos obtidos de farelo de arroz com a inibição da multiplicação dos fungos *Fusarium graminearum*, *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus flavus*, e a inibição da produção de aflatoxinas pelo último micro-organismo. Os compostos fenólicos foram extraídos com metanol e quantificados colorimetricamente com o reagente de Folin-Ciocalteu. A atividade antifúngica foi avaliada pela técnica de ágar diluído. Todos os fungos tiveram seu desenvolvimento inibido em até 2,3% inibição/ $\mu\text{g}_{\text{fenol total}}$ na presença do extrato fenólico de farelo de arroz, além da inibição da produção de micotoxinas em 100%. Esses dados sugerem que o arroz possui defesas naturais contra o ataque por essas espécies fúngicas analisadas, e que podem estar associadas à ocorrência de ácidos fenólicos na sua composição.

Palavras-chave. conservador natural, fenóis, inibição fúngica.

ABSTRACT

This investigation analyzed the association between the amounts of phenolic compounds extracted from rice bran and the inhibition of *Fusarium graminearum*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae* proliferation, and the inhibition of aflatoxin production by the latter microorganism. Phenolic compounds were extracted with methanol, and they were quantified by means of colorimeter assay using Folin-Ciocalteu reagent. The antifungal activity was assessed by means of diluted agar technique. The development of the all of fungi were inhibited up to 2.3% inhibition/ $\mu\text{g}_{\text{total phenol}}$ in the presence of rice bran phenolic extract, and the production of mycotoxins was inhibited by 100%. These findings suggest that the rice holds a natural defense against those fungal species attack, which might be associated with the occurrence of phenolic acids.

Keywords. conservative natural, phenols, fungal inhibition.

INTRODUÇÃO

A preocupação com a segurança alimentar vem norteando a busca por conservantes naturais na forma nativa ou extraídos de suas fontes e aplicados a outros ou aos seus próprios derivados. Estudos estão voltados para a identificação e purificação de novos compostos com atividade antifúngica que possam atuar sozinhos ou sinergicamente minimizando a deterioração e o uso dos antifúngicos químicos em alimentos^{1,2}.

Os compostos fenólicos presentes em tecidos vegetais podem inibir o desenvolvimento fúngico e a produção de micotoxinas que se localizam especialmente nos tecidos externos que têm papel de proteção da estrutura^{3,4}. Com essa propriedade, destacam-se os ácidos fenólicos e seus derivados presentes em vegetais. Dentre os vegetais considerados fontes de compostos fenólicos, encontram-se o arroz e seus derivados de beneficiamento, que são ricos em ácido ferúlico e cumárico^{5,6,7}.

O arroz (*Oryza sativa*) é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo. Sua importância destaca-se, principalmente, em países em desenvolvimento, tais como o Brasil, desempenhando papel estratégico em níveis econômico e social. O farelo de arroz constitui de 8 a 10% do grão de arroz e é rico em proteínas, lipídios, vitaminas e sais minerais. A composição química deste é influenciada por diversos fatores como variedade, tamanho, forma e resistência à quebra do grão, tipo de moinho, presença ou ausência de gérmen, uniformidade de moagem, além do processo de beneficiamento que tenha sofrido o grão^{8,9,10}.

No Brasil, o farelo de arroz é utilizado, principalmente, como matéria-prima para a extração de óleo, produção de ração animal e, em menor escala, como produto dietético e na composição de “multimistura”^{8,9,11}. Dessa forma, é interessante conhecer o potencial de resíduos de arroz como fonte de conservadores naturais para extração e utilização na preservação natural dos alimentos. Estimar a susceptibilidade do arroz à contaminação fúngica possibilita a tomada de medidas adequadas para armazenamento e beneficiamento.

Agentes antifúngicos presentes em vegetais são uma alternativa para substituir os aditivos químicos atualmente empregados em alimentos, especialmente no caso do arroz, cujo beneficiamento gera coprodutos com propriedades menos atrativas, que poderiam ser empregadas como fonte desses compostos¹.

Os fungos como *Aspergillus* e *Fusarium* são considerados importantes produtores de micotoxinas¹², que são metabólitos tóxicos naturais frequentemente encontradas em alimentos. Entre os tóxicos contaminantes de alimentos, podemos destacar as aflatoxinas produzidas por espécies do gênero *Aspergillus*, as quais são altamente tóxicas e carcinogênicas para homens e animais, tornando-se, assim, um fator preocupante para a indústria alimentícia¹³. Intoxicações e problemas passageiros ou crônicos, que afetam várias funções do organismo, tais como alterações hepáticas, renais, circulatórias, no sistema nervoso e no trato digestivo podem ocorrer em homens e animais devido à ingestão dessas substâncias.

Esses aspectos nortearam o trabalho, que objetivou relacionar os níveis de compostos fenólicos obtidos de farelo de arroz com a inibição da multiplicação dos fungos *Fusarium graminearum*, *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus flavus*, e a inibição da produção de aflatoxinas pelo último.

MATERIAL E MÉTODOS

Farelo de arroz

O arroz do cultivar BR-IRGA 417 foi cultivado em campos experimentais do Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA), localizado em Cachoeirinha (RS), semeada no sistema de cultivo mínimo, com densidade de semeadura de 100 kg.ha⁻¹. A adubação de base foi com 400 kg.ha⁻¹ (N:P:K = 05:20:30), nitrogenada em cobertura com 80 kg.ha⁻¹ de N, no arroz com 8 folhas antes do início da diferenciação do primórdio da panícula (DPP). Após a colheita, as amostras foram secas até 13% de umidade e beneficiadas na forma de arroz natural polido (branco). No beneficiamento, foram separadas as frações casca, farelo e endosperma amiláceo, sendo que a fração farelo de arroz foi encaminhada ao Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos (LMCA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) para realização dos experimentos.

Caracterização físico-química

O pH, a acidez, os teores de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos e fibra bruta do farelo de arroz foram determinados segundo AOAC¹⁴. Os carboidratos solúveis foram determinados por hidrólise ácida e quantificados com o reagente do 3,5-DNS¹⁵.

A extração dos compostos fenólicos foi realizada a frio com metanol, sob agitação em agitador horizontal à temperatura ambiente, seguida de partição com hexano,

clarificação com hidróxido de bário 0,1M e sulfato de zinco 5%, centrifugação e filtração. Os extratos foram secados em rotaevaporador, diluídos com água e armazenados em freezer a 6 °C, até quantificação e/ou posterior uso. O conteúdo de fenóis totais foi determinado por meio do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, tendo como padrão o ácido ferúlico^{16,17}.

Avaliação da atividade antifúngica

Os fungos utilizados neste estudo foram o *Fusarium graminearum* cedido pelo Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e cultivado em Agar batata dextrose (BDA) a 22 °C durante 10 dias, até sua completa esporulação. *Aspergillus oryzae* foi cedido pelo Laboratório de Micotoxicologia (LAMIC) da Universidade Federal de Santa Maria (RS) e *Aspergillus flavus* CCT 1217 adquirido da coleção de culturas da Fundação André Tosello. Os micro-organismos do gênero *Aspergillus* foram primeiramente cultivados em Agar batata dextrose a 24 °C durante 12 dias, até sua completa esporulação, e posteriormente mantidos a 4 °C, até o uso. Para o teste da atividade antifúngica, foi empregada uma solução de esporos de 4×10^6 esporos.mL⁻¹ obtidos dos esporos dos meios de cultura com solução 0,2% de Tween 80, filtração e enumeração de esporos em câmara de Neubauer.

O método utilizado foi o bioanalítico *in vitro*, observando o desenvolvimento ou inibição dos micro-organismos em presença de três níveis de concentrações de compostos fenólicos totais no extrato em avaliação. O extrato fenólico de farelo de arroz (15, 20 e 25 mL) foi adicionado ao meio de cultura previamente autoclavado a 120 °C durante 15 minutos. Os meios acrescidos dos extratos foram vertidos em placas de Petri (9 cm de diâmetro), sob condições assépticas (Câmara de Fluxo Laminar LABCONCO modelo 36210, Tipo B₂). Após a solidificação dos meios, foram adicionados ao centro das placas a solução de esporos, contendo 4×10^6 esporos.mL⁻¹ de cada espécie nos seus respectivos experimentos. As placas foram incubadas a 22 °C para *Fusarium graminearum* e 24 °C para *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus flavus*.

Foram efetuadas medições ortogonais dos diâmetros das colônias nos 3º, 5º, 7º e 14º dias de incubação, tendo como referência o desenvolvimento de cada espécie cultivada sem adição dos extratos e com adição do grupo controle, composto por água estéril, hidróxido de bário 0,1 M e sulfato de zinco 5%¹⁸. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Foi calculada e expressa a porcentagem de inibição do crescimento fúngico por µg de composto fenólico no extrato.

No experimento referente à ação antimicotóxicas dos extratos sobre o *Aspergillus flavus*, foi realizada a determinação de aflatoxinas no meio de crescimento das culturas ao 7º, 14º e 21º dias de incubação.

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

As aflatoxinas B₁ e B₂ foram extraídas dos meios de cultura com solução de acetonitrila-água (3:1), sob agitação, seguida de partição com hexano. A acetonitrila foi separada da água com adição de cloreto de sódio e evaporada a 50 °C, sob vácuo. O resíduo foi ressuspenso com 3 mL de metanol e 27 mL de clorofórmio, centrifugado e separado em três alíquotas de 10 mL, que foram evaporadas em banho-maria a 40 °C e corrente de nitrogênio e armazenadas a -10 °C^{19,20}. Os extratos evaporados foram aplicados em cromatofolhas de sílica gel G60 de 0,25 mm de espessura para triagem, confirmação e posterior estimativa da concentração das aflatoxinas B₁ e B₂ sob luz UV, comparativamente a solução padrão das aflatoxinas B₁ e B₂^{5,20,21}.

As micotoxinas mais importantes produzidas por *Aspergillus flavus* são as aflatoxinas B₁ e B₂, produzidas por cerca de 40% dos isolados²². Assim demonstrada a inibição da cultura, foi avaliado o efeito do extrato fenólico na produção das aflatoxinas mencionadas por meio do método de cromatografia de camada delgada (CCD). Esse método^{20,21} foi adaptado no Laboratório de Micotoxinas da Universidade Federal do Rio Grande para avaliar a produção de micotoxinas em um meio de cultura e para uma triagem de efeito dos compostos fenólicos sobre a produção de aflatoxinas, e vem se mostrando um método eficiente por apresentar limites de detecção comparáveis a outros métodos mais sofisticados, aplicabilidade e várias matrizes, baixo custo, rapidez e boa performance. O procedimento possuía como características que o tornaram confiável para o estudo, o limite de detecção de 2,0 ppb, recuperação de 96,5% para aflatoxinas B₁ e 91,5% B₂ e coeficiente de variação de 8%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das médias das determinações das características físico-químicas do farelo de arroz, ou seja, umidade, cinzas, carboidratos, fibra bruta, proteínas,

Tabela 1. Inibição fúngica do *A. flavus*, *A. oryzae* e *F. graminearum* pelo extrato fenólico de farelo arroz (EFFA)

Dias	% inibição / µg fenol total		
	<i>Aspergillus. oryzae</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Fusarium graminearum</i>
3	0,72 ± 0,03 ^{ak}	2,3 ± 0,09 ^a	0,81 ± 0,1 ^a
5	0,73 ± 0,02 ^a	2,3 ± 0,12 ^a	0,65 ± 0,15 ^a
7	0,7 ± 0,03 ^a	1,73 ± 0,12 ^b	Nr ^{**}
14	0,71 ± 0,03 ^a	1,6 ± 0,06 ^b	Nr

*Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa ao nível de confiança de 95%.

**Nr = medição do halo não realizada

Tabela 2. Inibição da produção de aflatoxina B₁ e B₂ pelo *Aspergillus flavus* na presença do extrato fenólico de farelo de arroz

Extrato	Fenóis(mg)	Inibição da produção de aflatoxinas (%)					
		7° dia		14° dia		21° dia	
		AFLAB ₁	AFLAB ₂	AFLAB ₁	AFLAB ₂	AFLAB ₁	AFLAB ₂
F.arroz	0,8	32 ± 1,4 ^a	82 ± 0,6 ^a	70 ± 0,9 ^a	92 ± 1,2 ^a	49 ± 1,1 ^a	88 ± 0,8 ^a
F.arroz	1,2	33 ± 2,1 ^a	91 ± 1,2 ^b	75 ± 1,5 ^a	100 ± 0 ^b	54 ± 2,4 ^a	91 ± 1,0 ^a
F.arroz	1,5	58 ± 1,1 ^b	91 ± 0,9 ^b	100 ± 0 ^b	100 ± 0 ^b	89 ± 2,1 ^b	100 ± 0 ^b

*Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa ao nível de confiança de 95%.

lipídios, pH e acidez, foram respectivamente: 9,6 ± 0,4%, 10,5 ± 0,8%, 44,3 ± 3,1%, 6,3 ± 1,1%, 15,4 ± 0,6%, 12,7 ± 0,4%, 6,1 ± 0,3%, 0,1 ± 0,03%. A composição centesimal determinada para o farelo de arroz foi semelhante à apresentada por outros autores, levando-se em conta as diferenças decorrentes do tipo de solo, do cultivar, do beneficiamento e da forma de estabilização do farelo^{8,10,23}.

Comparativamente a outros tecidos mencionados em literatura como funcionais pelo seu conteúdo fenólico, como banana 0,31 mg/g de amostra, batata 0,39 mg/g de amostra (equivalente de tirosina), 0,061-0,084 mg/g de amostra (ácido ferúlico)⁷, 0,5 mg/g de amostra em bagaço de laranja e 0,35 mg/g de amostra em polpa de berinjela¹⁷, o farelo de arroz mostrou-se promissor como potencial de aporte de compostos fenólicos na dieta, pois apresentou um teor médio de 0,75 mg CF/g de farelo de arroz, o que é superior a tecidos usualmente estudados como fontes desses compostos^{4,5,7,17} e com atividade antifúngica para as três espécies avaliadas (Tabela 1).

A Tabela 1 apresenta os resultados da inibição específica (% inibição/µg de CFT) para cada espécie fúngica no intervalo de tempo estudado.

Segundo a literatura, os grupos hidroxílicos presentes nos compostos fenólicos podem formar ligações de hidrogênio com enzimas do metabolismo microbiano, desativando-as e inibindo a multiplicação da biomassa fúngica^{23,24}, fato que foi demonstrado pela medida do halo de crescimento da colônia cultivada em presença dos extratos fenólicos de farelo de arroz.

Os resultados referentes à adição dos extratos fenólicos de farelo de arroz ao meio de cultura se

apresentaram mais eficazes para a inibição do *Aspergillus flavus*.

Na Tabela 2, estão os resultados dos experimentos referentes à inibição da produção das aflatoxinas B₁ e B₂ por *Aspergillus flavus* em meio BDA em presença de extratos fenólicos de vegetais, no 7°, 14° e 21° dias de incubação. Os percentuais de inibição foram calculados considerando a não detecção das toxinas nos limites de quantificação do método com 100% de inibição.

Os resultados demonstraram que os extratos fenólicos foram mais eficientes para inibir a produção de AFA B₂. A inibição da síntese das micotoxinas pelos extratos fenólicos pode ser atribuída à diminuição do estresse oxidativo, que é um pré-requisito para a produção de aflatoxinas, além do aumento da peroxidação lipídica e a geração de radicais livres²⁵. Resultado similar de inibição de produção de toxina foi obtido por Selvi et al.²⁶, que inocularam o *Aspergillus flavus* em presença do extrato da *Garcinia indica*, planta rica em flavonoides e ácidos fenólicos, e obtiveram uma inibição de 40 a 60% na produção de aflatoxina B₁ e inibição de 10 a 20% do crescimento fúngico.

Os resultados de inibição de crescimento fúngico e da produção de micotoxinas foram consistentes entre si e indicaram que o farelo de arroz possui defesas importantes contra o ataque de *Aspergillus flavus* e das demais espécies, o que é interessante do ponto de vista de segurança alimentar. Do ponto de vista tecnológico, torna-se vantajoso buscar formas de extrair compostos fenólicos das frações externas do grão de arroz, visando empregá-los como antifúngicos naturais.

CONCLUSÃO

O extrato fenólico de farelo de arroz apresentou atividade antifúngica sobre os fungos *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium graminearum*, inibindo em até 100% a produção de aflatoxina B₁ e B₂.

REFERÊNCIAS

1. Brul S, Klis FM. Mechanistic and Mathematical Inactivation studies of food spoilage fungi. *Fungal Genet Biol*. 1999;27:199-208.
2. Melo EA, Guerra NB. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. *Bol Soc Bras Ciênc Tecnol Alim*. 2002;36:1-11.
3. Albayrak S, Aksoy A, Sagdic O, Hamzaoglu E. Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey. *Food Chem*. 2010;119:114-22.
4. Souza MM, Oliveira MS, Rocha M, Furlong EB. Avaliação da atividade antifúngica de extratos fenólicos de cebola, farelo de arroz e microalga *Chlorella phyrenoidosa*. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2010;30(3):680-5.
5. Oliveira MS, Badiale-Furlong E. Screening of antifungal and antimycotoxigenic activity of plant phenolic extracts. *World Mycotoxin J*. 2008;1(2):1-10.
6. Tian S, Nakamura K, Cui T, Kayahara H. High-performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in rice. *J Chromatogr A*. 2005;1063:121-8.
7. Zhou Z, Robards K, Helliwell S, Blanchard C. The distribution of phenolic acids in rice. *Food Chem*. 2004;87(3):401-6.
8. Walter M, Marchezan E, Avila LA. Arroz: composição e características nutricionais. *Ciênc Rural*. 2008;38(4):1184-92.
9. Lemos MRJ, Souza-Soares LA. Arroz e seus produtos e subprodutos na região sul do Brasil. *Rev Vetor*. 2000;10:21-36.
10. Silva MA, Sanches C, Amante ER. Farelo de arroz – Composição e propriedades. *Rev Óleos & Grãos*. 2001;34-42.
11. Lemos MRJ, Souza-Soares LA. Farelo de arroz: um subproduto em estudo. *Rev Óleos & Grãos*. 1999;40-7.
12. Nunes IL, Badiale-Furlong E. Arroz comercializado na região sul do Brasil: aspectos micotoxicológicos e microscópicos. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2003;23(2):190-4.
13. Granada G, Rosa V, Zambiasi R, Koetz P. Caracterização de granolas comerciais. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2003;23(1):87-91.
14. Association of Official Analytical Chemist (AOAC). Official Methods of analysis international, 17^o, CD-ROM, Willian Horwitz, 2000.
15. Miller GL. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of sugar. *Anal Chem*. 1959;3(31):326-428.
16. Souza MM, Recart VM, Rocha M, Cipolatti EP, Badiale-Furlong E. Estudo das condições de extração de compostos fenólicos de cebola (*Allium cepa* L.). *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(2):192-200.
17. Badiale-Furlong E, Colla E, Bortolato DS, Baisch AM, Souza-Soares LA. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. *Rev Vetor*. 2003;13:105-14.
18. Nguéack J, Leth V, Amvam Zollo PH, Mathur SB. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. *Int J Food Microbiol*. 2004;94(3):329-34.
19. Garda J, Macedo RM, Badiale-Furlong E. Determinação de tricotecnos em cerveja e avaliação de incidência no produto comercializado no Rio Grande do Sul. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2004;24:657-63.
20. Soares LMV, Rodriguez-Amaya DB. Survey of Aflatoxins, Ochratoxin A, Zearalenone, and Sterigmatocystin in some brazilian foods by using multi-toxin-layer chromatographic method. *J Assoc Offic Anal Chem*. 1989;1(72):22-6.
21. Tanaka T, Yoneda A, Inoue S, Sugiura Y, Ueno Y. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gás chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2000;882:23-8.
22. Tanawaki MH, Silva N. Fungos em alimentos: Ocorrência e detecção. Núcleo de Microbiologia/ITAL; p. 2001.
23. Naves MMV. Características químicas e nutricionais do arroz. *Bol CPPA*. 2007;25(1):51-60.
24. Juglal S, Govinden R, Odhav B. Spice oils for the control of co-occurring micotoxin-producing fungi. *J Food Prot*. 2002;65(4):683-7.
25. Jayashree T, Subramayam C. Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Free Rad Biol Med*. 2000;29:981-5.
26. Selvi AT, Joseph GS, Jayaprakasha GK. Inhibition of growth and aflatoxin production in *Aspergillus flavus* by *Garcinia indica* extract and its antioxidant activity. *Food Microbiol*. 2003;2:455-60.