

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS
CAMPUS DE CAMPO MOURÃO

POLIANA DOS SANTOS MENDES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA CURCUMINA SOBRE FUNGOS
DETERIORANTES DO PÃO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2017

POLIANA DOS SANTOS MENDES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA CURCUMINA SOBRE FUNGOS
DETERIORANTES DO PÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Diplomação, do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos do Departamento Acadêmico de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Regina Ferreira Geraldo Perdoncini.

CAMPO MOURÃO

2017



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA
FEDERAL DO PARANÁ
Campus Campo Mourão
Departamento Acadêmico de Alimentos



TERMO DE APROVAÇÃO
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA CURCUMIA SOBRE FUNGOS
DETERIORANTES DO PÃO

por

POLIANA DOS SANTOS MENDES

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 29 de novembro de 2017 como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo de Alimentos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Profa. Dra. Márcia Regina Ferreira Geraldo Perdoncini.
Orientador

Msc. Livia Benessi Marchi
Coorientador

Profº. Dr. Augusto Tanamati
Membro da banca

Profª. Msc. Idinea Fernandes dos Santos Perreira
Membro da banca

Nota: O documento original e assinado pela Banca Examinadora encontra-se no Departamento Acadêmico de Alimentos da UTFPR Campus Campo Mourão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo de minha vida, e não somente nestes anos como universitária, mas que em todos os momentos é o maior mestre que alguém pode conhecer.

Agradeço a minha professora e orientadora, Dra. Márcia Regina Ferreira Geraldo Perdoncini, pela enorme contribuição, paciência e dedicação ao longo dessa orientação, que não mediu esforços para o desenvolvimento deste trabalho e por sempre estar disponível para ajudar contribuindo com meu crescimento profissional.

Aos meus pais, pelo amor, carinho, paciência e seus ensinamentos. Agradeço de forma especial ao meu pai Paulo Arivonil Mendes e à minha mãe Luciane dos Santos, por não medirem esforços para que eu pudesse levar meus estudos adiante. O meu eterno agradecimento. Amo vocês.

Obrigada aos meus irmãos, Paula Camila dos Santos Mendes e João Lucas Mendes, que nos momentos de minha ausência dedicados aos estudos, sempre fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente.

Aos professores membros da banca examinadora. E a todos os professores que tive oportunidade de conhecer durante as disciplinas que compartilharam seus conhecimentos, contribuindo não apenas com meu crescimento profissional, mas também como meu crescimento pessoal. Em especial ao Professor Odinei que contribuiu com a Curcumina.

Agradeço aos amigos que foram ficando e se transformaram na minha família do coração! Em especial as minhas amigas, Laila Crystina de Grandis e Karina Bartko, por todo apoio e por estarem sempre ao meu lado.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente para a conclusão desta graduação.

RESUMO

MENDES, P. S. **Atividade antifúngica da curcumina contra fungos deteriorantes em pães**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Tecnologia em Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Campo Mourão, 2017.

A curcumina é o principal componente ativo da *Curcuma longa* L., geralmente usado como corante e aromatizante por possuir coloração e aroma forte. A curcumina vem despertando um interesse cada vez maior pela possibilidade de ser utilizada na substituição de conservantes sintéticos, por possuir atividade antimicrobiana e antifúngica. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da curcumina sobre a inibição do crescimento fúngico em fungos isolados de pães. Analisou-se a concentração inibitória mínima (CIM), o diâmetro micelial da colônia, o peso seco da colônia e a porcentagem de inibição fúngica do peso seco e do diâmetro do micélio das espécies *Penicillium paneum* e *Penicillium citrinum*. As análises foram realizadas em duplicata e todas as concentrações da curcumina apresentaram inibição fúngica.

Palavras-chaves: Curcumina; Inibição fúngica; *Penicillium*.

ABSTRACT

MENDES, P. S. **Antifungal activity of curcumin against deteriorating fungi in breads.** 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Tecnologia em Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Campo Mourão, 2017.

Curcumin is the main active component of *Curcuma longa* L. Generally used as a dye and flavoring because it has a strong color and aroma. Curcumin has been increasing interest in the possibility of being used in the synthesis of synthetic preservatives, because it has antimicrobial and antifungal activity. The purpose of this work was to evaluate the effect of curcumin on the inhibition of fungal growth in fungi isolated from bread. The minimum inhibitory concentration (MIC), mycelial diameter of the colony, dry weight of the colony and percentage of fungal inhibition of dry weight and mycelial diameter of the species *Penicillium paneum* and *Penicillium citrinum* were analyzed. The analyzes were performed in duplicate and all concentrations of curcumin showed fungal inhibition.

Keywords: Curcumin; Fungal inhibition; *Penicillium*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Concentração de inibição mínima (CIM).....	22
Figura 2 – Isolado <i>Penicillium Paneum</i>	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados da avaliação da concentração inibitória mínima.....	23
Tabela 2 – Diâmetro de porcentagem de inibição micelial em diferentes concentrações de CURC.....	24

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 CURCUMINA	13
3.2 PRODUTOS PANIFICÁVEIS	14
3.3 FUNGOS	15
4 MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 LOCAL	18
4.2 AMOSTRAS	18
4.3 MICRO-ORGANISMOS	18
4.3.1 Identificação molecular dos fungos baseado no sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2	18
4.4 MATERIAIS	19
4.5 MEIOS DE CULTURA	19
4.6 PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA	19
4.7 VERIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL E DO PESO SECO	20
4.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MINIMA	21
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	23
6 CONCLUSÃO	26
RERERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1 INTRODUÇÃO

Define-se como alimento de qualidade aquele que atende de forma confiável, segura e no tempo certo as necessidades dos seus consumidores. A percepção de qualidade de um alimento não se limita somente ao prazo de validade, também são avaliados critérios como sabor, aparência entre outros fatores intrínsecos. Uma vez que não aplicado as boas práticas de fabricação podem acarretar danos à saúde, como toxinfecções (XAVIER, 2009).

A presença de agentes estranhos aos alimentos naturais ou industrializados mesmo quando consumidos tradicionalmente dentro de hábitos alimentares pré-estabelecidos, podem causar reações desagradáveis, imediata ou tardia. Com isso, procura-se melhorias no método de conservação, com pequenas modificações na composição dos alimentos, tratamentos culinários ou tecnologias adequadas podem tornar o alimento mais atrativo e com um tempo de vida útil maior (MIDIO, 2000).

Um dos principais responsáveis pela reação química de deterioração em produtos alimentícios são os fungos e seu desenvolvimento está relacionado a fatores tanto extrínsecos como intrínsecos do alimento. A contagem de bolores e leveduras é importante para se determinar o prazo de validade do produto, pois a presença excessiva destes microrganismos resulta na redução do tempo de vida útil do mesmo (SILVA, 2012).

A busca por um processo prático e viável de tratamento dos componentes naturais para a aplicação de conservação de alimentos com resultados satisfatórios abre um campo de pesquisa a ser explorado. Os rizomas numerosos da *Cúrcuma longa* (açafrão) têm sido usado em tratamentos de alimentos, por possuir propriedades anti-inflamatórias e antissépticas. O principal componente extraído da cúrcuma é a curcumina, pigmento de tom amarelo limão brilhante a alaranjado também responsável por ações bioativas (VOLP; RENHE. STRINGUETA, 2009).

Existe grande interesse em substituir os conservantes artificiais por conservantes naturais nos alimentos. As substâncias naturais, de origem vegetal, tornam o alimento mais atrativo ao consumidor, além de aumentar a vida útil pela capacidade bacteriostática e bactericida, retarda o início da deterioração e o crescimento de microrganismos indesejáveis (MACIEL et al., 2012).

Há um crescimento na exploração comercial da curcumina para as indústrias, por esta apresentar várias atividades, dentre elas a antifúngica. O consumo da curcumina é

considerado seguro quando empregada como aditivo alimentar (VOLP; RENHE. STRINGUETA, 2009).

A curcumina apresenta atividade antimicrobiana em testes *in vitro* e o potencial antimicrobiano para bactérias e fungos é de interesse para a área de alimentos (NAGUETINI, 2006).

Visto que há grande preocupação com a deterioração dos alimentos, e visando contribuir com a boa qualidade dos produtos panificados, este trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antifúngica da Curcumina na inibição do desenvolvimento de fungos deteriorantes de pães.

Todos os produtos de panificação com elevada atividade de água podem ser colonizados por fungos. Deste modo, pães, bolos e panetones estão amplamente expostos e contaminações. Essas contaminações podem ser reduzidas ou evitadas por meio de prevenção ou do retardamento do crescimento dos fungos. Diversos métodos têm sido utilizado ao longo das últimas décadas visando atingir esses objetivos e, por consequências aumentar o período de prateleira dos produtos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da curcumina sobre a inibição do crescimento fúngico em fungos isolados de pães.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar o meio de cultivo com diferentes concentrações de curcumina;
- Avaliar a atividade da curcumina sobre o crescimento micelial dos fungos isolados, através do diâmetro da colônia;
- Avaliar a atividade do pó da curcumina sobre o crescimento micelial, através da verificação do diâmetro da colônia;
- Avaliar a atividade da curcumina sobre o peso seco dos fungos isolados.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CURCUMINA

O açafrão (*Cúrcuma longa* L.), também conhecido como cúrcuma, gengibre dourado ou açafrão da Índia, é uma espécie originária do sudeste asiático, pertencente à família das *Zingiberaceae*. É uma planta de pequeno porte que mede aproximadamente 1 metro, composta de um rizoma principal com várias ramificações menores, todas marcadas com anéis de brácteas secas. Largamente cultivada nos países asiáticos, não se restringe apenas à alimentação, e hoje está presente em diversas áreas da indústria, medicina, agricultura, entre outros (VILELA & ARTUR, 2008). Quando cortados, os rizomas mostram uma superfície de cor vermelha alaranjada, proveniente da presença do pigmento curcumina. Possui cheiro forte agradável e sabor aromático e picante (MATOS, 2000).

A cúrcuma é uma planta medicinal que tem uma longa raiz cor de laranja que é transformada em pó e usada como especiaria em vários países, especialmente na Índia. Esta planta também pode ser conhecida como açafrão-da-índia, açafrão-da-terra ou tumérico (VILELA e ARTUR, 2008).

Os principais componentes químicos dos rizomas da cúrcuma são os curcuminóides ou polifenóis naturais (curcumina, desmetoxicurcumina, bisdesmetoxicurcumina, em concentrações de 60, 22 e 18%, respectivamente, recentemente um quarto pigmento foi identificado denominado de cyclocurcumina) e, em menores proporções (2,5 a 5%), óleos essenciais compostos principalmente por turmerona, dehidroturmerona e cetonas aromáticas, responsáveis pelas excelentes propriedades sensoriais (ALMEIDA, 2006).

A importância de *C. longa* para a saúde mudou consideravelmente desde a descoberta da propriedade antioxidante, por meio da presença de compostos fenólicos, como os curcuminóides, os quais inibem a produção de espécies reativas de oxigênio (SREEJAYAN, 1994).

Os pigmentos que fornecem a cor à cúrcuma pertencem a classe dos diferoluilmetano e são representados principalmente pela Curcumina, cuja concentração pode variar de 1,5 a 7,1% (GOVINDARAJAN, 1980).

A atividade microbiana da cúrcuma foi relatada por vários autores. De acordo com BHAVANISHANKAR et al. (1979), o extrato alcoólico da curcumina foi testado *in vitro* na concentração de 2,5 a 50 mg/100 mL e apresentou atividade antimicrobiana frente a

Staphylococcus aureus. O extrato alcoólico também promoveu inibição do crescimento atuando como fungistático com o *Aspergillus parasiticus* (LUTOMSKI et al, 1974).

Em testes realizados pulverizando uma suspensão preparada com água, tween 80 e curcumina isolada na concentração de 250 mg/L apresentou atividade antifúngica para *Phytophthora infestans*, *Puccinia recondita* e *Rhizoctonia solani* (KIM et al, 2001).

Entre os pigmentos curcuminóides encontrados na curcuma, está a curcumina, 1,7-bis-(hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, possui dois grupos metoxila (OCH₃) (MARTINS e RUSIG, 1992).

3.2 PRODUTOS PANIFICÁVEIS

Alimentos de uma maneira geral são muito propensos a contaminações por fungos, uma vez que constituem-se de substâncias orgânicas e, dentre elas, inúmeros nutrientes. É inevitável que certas condições ambientais tornem-se bolorentas, e assim, via de regra impróprio para o consumo humano. Porém certos fungos (leveduras) são de extrema importância na produção de alimentos como bebidas fermentadas, produtos de panificação e queijos (MIDIO, 2000).

A deterioração de produtos panificáveis inicia-se com a contaminação pós processo e termina com a formação de micélios visíveis durante o armazenamento (DAGNAS et al, 2017).

Após sair do forno o pão encontra-se estéril, tornando-se contaminado no resfriamento e no momento do corte (fatiagem) ou ainda na embalagem (VILJOEN; VON HOLY, 1997). O principal veículo de introdução de esporos fúngicos para os produtos de panificação é a farinha, que contém normalmente elevada carga de esporos. Em virtude de seu elevado valor nutritivo, teor de umidade (em torno de 40%), o pão em todas as suas formas está sujeito ao ataque de fungos, apresentando uma vida de prateleira que varia de 3 a 7 dias (FREIRE, 2011).

Os microrganismos são capazes de crescerem em alimentos com alto teor de umidade alto ou intermediário, como pães e produtos de panificação. A deterioração desses produtos por fungos geram grandes perdas, estimadas globalmente em 3% do volume total de produção (MALKKI e RAVHA, 1978, DAGNAS et al., 2017).

Os fungos são capazes de crescer em uma ampla escala quanto as condições de atividade de água (aw), pH e temperatura. E podem utilizar uma grande diversidade de substratos como carboidratos, ácidos orgânicos, proteínas e lipídeos (FREIRE, 2011).

Todos os produtos de panificação com elevada atividade de água podem ser colonizados por fungos. Desta maneira bolos, pães e panetones estão amplamente expostos a contaminações. Embora não existam informações precisas, estima-se que em países tropicais, como o Brasil, as perdas podem atingir até 10% da produção anual. Tanto as perdas econômicas quanto a possível presença de micotoxinas em produtos de panificação podem ser reduzidas ou evitadas por meio da prevenção ou do retardamento do crescimento dos fungos. Diversos métodos estão sendo estudados visando atingir esse objetivo e resultando também em um aumento de vida de prateleira (FREIRE, 2011).

3.3 FUNGOS

Os fungos são microrganismos eucariontes, multicelulares e filamentosos, que podem ocasionar mudanças desejáveis como a fermentação de alimentos. Todavia, em muitos outros podem causar transformações indesejáveis nas características dos alimentos, produzindo odores e sabores desagradáveis, causados por diferentes graus de deterioração, podendo ainda trazer riscos à saúde humana e animal devido a produção de micotoxinas (OLIVEIRA et al, 2013).

Seja no armazenamento, ou por meio de instrumentos utilizados em seu manejo, os alimentos estão passíveis de sofrerem contaminações, incluindo as fúngicas. Essa contaminação ocorre pela interação do contaminante ao produto, podendo ser incorporado ao alimento durante o manejo, oferecendo risco à saúde do consumidor. Dentre os fungos contaminantes destacam-se os gêneros *Aspergillus fusarium* e *Penicillium*, responsáveis pela produção de micotoxinas (GONÇALEZ et al., 2013).

A atividade antifúngica que as plantas possuem tem sido estudada devido a resistência de patógenos. Com isso estimula a procura de novas substâncias antifúngicas principalmente de origem vegetal, que tem sido eficaz contra fitopatógenos. Os extratos naturais de plantas são de interesse e são uma alternativa para evitar a contaminação de alimentos ou rações por fungos (CENTENO; CARRERA, 2013).

Comumente os gêneros de fungos encontrados em produtos de panificação são: *Aspergillus*, *Chrysonilia*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor*. Entre as espécies que ocorrem com maior frequência estão *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Penicillium* (FREIRE, 2011).

Os fungos são microrganismos eucariontes, uni ou multicelulares, que absorvem nutrientes dispostos no ambiente. Os que produzem estruturas filamentosas,

denominados de bolores, sendo que as células são cilíndricas e estão ligadas nas extremidades para formar um filamento chamado de hifa, que pode apresentar esporos. Individualmente essas hifas são microscópicas, porém quando uma grande quantidade de hifas se acumulam em um pedaço de pão, a massa fúngica denominada micélio é visível a olho nú (PELCZAR et al, 1996).

O gênero *Penicillium* sp. possui maior quantidade de espécies e pode ser encontrado em quase todos os substratos. Podendo eventualmente contaminar os alimentos de forma acidental, por habitar no solo. Algumas têm alto poder de causar patologias graves e destrutivas em frutos e cereais. Crescem em temperaturas amenas e na presença de oxigênio. São capazes de causar deterioração alimentar em alimentos mantidos sob refrigeração (MEIRELES & SREBERNICH, 2008).

Os mofos e as leveduras são mais tolerantes a baixas atividades de água e pH ácido do que as bactérias. Por essa razão, deterioram vegetais e produtos de panificação. Os fungos produzem grande quantidade de esporângios coloridos que são visíveis nos alimentos. O pão é deteriorado por *Rhizopus nigricans* (mofo de pão, manchas pretas), *Penicillium* (mofo verde), *Aspergillus* (mofo verde) e *Neurospora sitophila* (pão avermelhado) (FORSYTHE, 2013).

Dentro do gênero *Penicillium* encontra-se a espécie *P. citrinum* que possui colônias aveludadas com alta esporulação e coloração azul intenso, cinza ou verde na superfície, e coloração amarela alaranjada no reverso da colônia. Quando cultivadas no meio MEA (Malte Extract Agar) apresentam crescimento rápido e são menos densas, com diâmetro de 24-41 mm após 7 dias. Não ocorre o crescimento em temperaturas acima de 37°C e produz a micotoxina citrinina. O *P. citrinum* é comum em regiões temperadas, atinge diversos tipos de alimentos e é muito comum no solo e no ar. Outra espécie de *P. panemun*, a qual produz colônias verde e azul com uma superfície aveludada, sendo responsável pela produção da patulina, uma micotoxina altamente tóxica. Este é encontrado principalmente em pães e cresce bem em temperaturas baixas, tolerando níveis de pH ácidos além de baixa concentração de O₂ e altas concentrações de CO₂. Suporta níveis elevados de acetato de etila, ácido acético, ácido propiônico e ácido láctico (SAMSON E FRISVAD, 2004).

Penicillium citrinum é mesofílica, conhecido por seus penicilos, que consiste de 3 a 5 sétulas divergente contendo longas e definidas colinas de conídios. Apresenta temperatura mínima de crescimento a 5°C e temperatura ótima entre 26 e 30°C. Pode se desenvolver em atividade de água mínima de 0,8 a 25°C (PITT E HOCKING, 2009).

Penicillium paneum se dá devido a ocorrência de fungos ácidos orgânicos. Esse fungo é comumente associado a deterioração de produtos fermentados como queijos, iogurtes, pães e cacau. *P. paneum* se multiplica bem em temperaturas de 20 a 25°C e apresenta alta taxa de crescimento micelial entre as espécies da mesma seção. Conhecido por formar colônias baixas, estrutura de frutificação em forma de conidióforos agrupados, conídios globosos de coloração verde escuro e azulado escuro (SAMSON E FRISVAD, 2004).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCAL

As análises foram realizadas no laboratório de Engenharia e Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Campo Mourão - PR.

4.2 AMOSTRAS

Para a realização deste trabalho foi utilizado o padrão da curcumina, doado pelo professor Odinei.

4.3 MICRORGANISMOS

Foram isolados cinco espécies de fungos de pães deteriorados: *Penicillium panemun*, *Penicillium citrinum*, *Cladosporium oxysporum*, *Cladosporium sublifforme* e *Aspergillus chevalieri*.

Os fungos foram isolados a partir de pães de forma tradicional e integral, gentilmente cedidos pela indústria de pães congelados e assados, Empresa Brasileira de Comercialização - EBC Alimentos, localizada em Maringá-PR. Os fungos foram cultivados em meio BDA, isolados e purificados por método monospórico em ágar-água. As cepas isoladas foram encaminhadas ao Laboratório de Biotecnologia Microbiana em Maringá para identificação molecular.

Para realização deste trabalho foram utilizado as espécies de fungos *Penicillium panemun*, *Penicillium citrinum*.

4.3.1 Identificação molecular dos fungos baseado no sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2

A identificação molecular dos fungos foi realizada na Universidade Estadual de Maringá.

O DNA genômico dos fungos foi extraído utilizando o kit de extração “Power Soil DNA Isolation kit” (MoBio Laboratories, Inc.) seguindo as instruções da fabricante, com

exceção da fase inicial, onde os fungos foram crescidos em caldo BD (Batata-dextrose) e utilizado cerca de 200mg de micélio para extração. A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 1%.

Para amplificação da região de rRNA ITS1-5.8S-ITS2 foi realizada a reação da polimerase em cadeia (PCR) utilizando os primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE et al., 1990) de acordo com metodologia descrita previamente por Rhoden et al. (2012).

Os produtos de PCR foram purificados utilizando as enzimas shrimp alkaline phosphatase e exonuclease I (Sigma-aldrich). O sequenciamento foi realizado na plataforma de sequenciamento ABI-Prism 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Os resultados foram analisados utilizando o software BioEdit 7.2.5. As sequências de nucleotídeos foram então comparados com outras disponíveis no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando a ferramenta nBLAST, com filtragem para "type strains". As sequências mais similares foram então resgatadas e alinhadas utilizando o software MEGA v.6.05 com o método "neighbor-joining", com "p-distance" para nucleotídeos, com a opção "pairwise gap deletion" e bootstrap com 10.000 repetições para a construção filogenética.

4.4 MATERIAIS

Os materiais utilizados foram câmara de fluxo laminar (marca Bio Seg), Erlenmeyer, autoclave vertical (marca Phoenix), espátulas, placas de Petri descartáveis, balança analítica e estufa de cultura (marca Fanem LTDA).

4.5 MEIOS DE CULTURA

BDA (ágar batata dextrose) da Kasvi Laboratories, MEA (ágar extrato de malte) da Kasvi Laboratories, ASD (ágar Sabouraud Dextrose) da Biomark Laboratories Pune 411041 Índia e RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium).

4.6 PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA

O meio RPMI-1640 foi utilizado para o teste da concentração inibitória mínima é um meiocompletamente definido (com glutamina, sem bicarbonato e com vermelho de

fenol como indicador de pH) sendo considerado satisfatório para ensaios de compostos antimicrobianos com fungos filamentosos e utilizado como meio padrão da norma de terapia antifúngica M38-A (NCCLS). O meio foi preparado pesando-se 10,4g de meio RPMI-1640 em pó e 34,53g de tampão MOPS (ácido 3- [N-morfolino] propanosulfônico). O meio em pó foi dissolvido em 900mL de água destilada. Foi adicionado MOPS (concentração final de 0,165 mol/L), agitando até dissolver. Durante a homogeneização o pH foi ajustado para 7,0 a 25°C usando hidróxido de sódio 1 mol/L. Foi acrescentado água adicional para levar o meio a um volume final de 1 L. A esterilização ocorreu por filtração e o armazenamento a 4° C até o momento do uso.

Os demais meios de cultura (BDA, ASD e MEA) foram preparados adicionando-se a quantidade necessária dos meios em pó em água destilada, conforme instruções do fabricante e dissolvido por aquecimento sob agitação constante, até completa dissolução do ágar. Em seguida, os meios foram esterilizados em autoclave a uma temperatura de 121°C por 20 minutos e vertidos em placas de Petri estéreis. Os meios MEA e BDA foram utilizados para o cultivo dos fungos e realização dos ensaios de crescimento micelial e peso seco. Para a verificação da concentração fungicida mínima foi utilizado o meio ASD.

Para a realização dos ensaios de verificação do crescimento micelial e peso seco, foi adicionado a curcumina nas concentrações de 1 e 3% ao BDA e estes foram considerados meios testes. Os meios sem a curcumina foram utilizados como meio controle. Após a esterilização, os meios foram vertidos em placas de Petri estéreis.

4.7 VERIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL E DO PESO SECO

Com o auxílio de um anel metálico esterilizado de 5mm de diâmetro, foram retirados plugs de cada uma das espécies fúngicas crescidas em BDA e colocados no centro das placas de petri com o meio BDA, em seguida foram incubados na estufa por quatro dias a 25°C. A partir destas colônias foram retirados plugs e inoculados em placas de Petri com os meios controle e testes e incubados a 25°C por 7 dias.

Para a avaliação da atividade da curcumina contra o crescimento micelial e peso seco, foi utilizada a técnica descrita por MARQUES et al., 2004 com modificações. O diâmetro da colônia foi medido através de medidas em milímetros de dois diâmetros de cada colônia crescidas nos meios testes e controle, no sétimo dia de incubação.

A porcentagem de inibição foi obtida através da equação 1, de ALBUQUERQUE et al., (2006) modificada por TIAN et al., (2011).

Equação 1: Porcentagem de inibição

$$\frac{D_c - D_t}{D_c} \times 100$$

Em que:

D_c = diâmetro do controle;

D_t = diâmetro do teste.

A determinação do peso seco foi feita após 7 dias de incubação dos isolados a 25°C em meios BDA controle e testes. Para isso, o meio com o cultivo foi liquefeito em autoclave a 100°C e o micélio foi retirado com uma pinça. Em seguida, o micélio foi transferido para papel de filtro previamente pesado. Os papéis com o micélio foram levados à estufa a 70°C e após 72 horas foram pesados diariamente até atingirem peso constante, que foi considerado o peso final. O peso seco foi determinado pela diferença entre o peso final e o peso do papel de filtro. A porcentagem de inibição do peso foi obtida através da fórmula ALBUQUERQUE et al., (2006) modificada por TIAN et al., (2011), adaptada para peso seco.

4.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada de acordo com o documento da CLSI, norma M38 A preconizada pela National Committee for Clinical Laboratory Standart (NCCLS, 2002), que traz o Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos, com adaptações para macrodiluição em caldo para fungos filamentosos. Para a realização do CIM (concentração inibitória mínima) foram utilizados 12 tubos testes contendo o meio RPMI.

Os fungos foram inoculados em BDA por 7 dias à 25° C para o crescimento e produção dos esporos. Após, uma solução estéril de tween 80 a 0,1%, foi vertida sobre o micélio e feita a raspagem da colônia para liberação dos esporos, os quais foram

contados em Câmara de Newbauer. O inóculo foi diluído para uma concentração final de 10^4 esporos/ml, o qual foi utilizado para a determinação da CIM. Esse procedimento foi realizado para cada um dos isolados.



Figura 1. Concentração de inibição mínima (CIM)

Para a análise da CIM, foram utilizados 12 tubos por fungo, 10 como tubos testes contendo solução de RPMI e a suspensão de CURC (padrão da curcumina), e os demais como controle positivo (apenas o meio e o inóculo - tubo 11) e controle negativo (apenas o meio - tubo 12). Nesta bateria de tubos (figura 1), foi adicionado 500 μ L do meio RPMI nos tubos 2 ao 10 e 1000 μ L no tubo controle negativo. Nos tubos 1 e 2 foi adicionado 500 μ L de CURC a 200 mg/ml. A partir do tubo 2 foi realizada uma diluição seriada 1:2 de CURC até o tubo 10 transferindo-se 500 μ L de para cada tubo teste e ao final desprezando 500 μ L do tubo 10. Adicionou-se 500 μ L suspensão do fungo 10^4 esporos /ml nos tubos testes (tubo1 ao tubo 10) e controle positivo (tubo 11), reduzindo a concentração de CURC em cada tubo pela metade. Os tubos foram agitados levemente para a homogeneização do conteúdo, e incubados em estufa a 35°C por 48 horas. Após este período, foi verificado o crescimento através da turvação do meio e confirmação em microscópio estereoscópio. Foi considerada CIM, a menor concentração em que a CURC impediu o crescimento do inóculo em teste.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Tabela 1, podemos observar os resultados obtidos durante a avaliação da concentração inibitória mínima. Foi possível observar que nas concentrações mais elevadas de CURC houve maior inibição fúngica. Porém, o fungo *Penicillium paneum* (Pp) foi o fungo que apresentou maior inibição, a CIM foi de 1,25% e para o *Penicillium citrinum* (Pc) o CIM foi 5%.

Tabela 1. Resultados da avaliação da concentração inibitória mínima

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
[]%	10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,156	0,078	0,039	0,019
Pp	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Pc	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

*Tubos que não representam crescimento fúngicos (-); tubos que apresentam crescimento fúngicos (+).

* [] %: concentração em porcentagem; Pp: *Penicillium paneum*; Pc: *Penicillium citrinum*.

De acordo com LUTOMSKI et al. (1974), o extrato alcoólico da curcumina testado *in vitro*, apresentou atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* na concentração de 2,5 a 50mg/100mL. Em testes com o *Aspergillus parasiticus*, o extrato também promoveu a inibição de crescimento atuando como fungistático.

Demais estudos também apontam a capacidade antifúngica e antimicrobiana dos compostos presentes na curcuma. A ação antimicrobiana do óleo de *Curcuma longa* L. foi comprovada sobre fitopatógenos como os fungos *Alternaria brassicicola* e *Aspergillus flavipes* por NAGHETINI (2006).

Segundo SOUZA et al (2010), o extrato do açafraão é eficiente no controle *in vitro* do crescimento do fitopatógeno *C. lindemuthianum*, inibindo o crescimento.

Os resultados encontrados na verificação do diâmetro do micélio, peso seco, porcentagem de inibição micelial e porcentagem de inibição do peso seco dos fungos estão descritos na Tabela 2. Observa-se que todos os isolados inoculados em meio teste obtiveram diferença no tamanho do micélio quando comparados aos isolados do meio controle.

Tabela 2. Diâmetro de porcentagem de inibição micelial em diferentes concentrações de CURC.

CURC: Padrão de curcumina; F: fungos; D: média do diâmetro da colônia em mm após 7 dias de

F	CD		**C1%				**C3%			
	D	P	D	%D	P	%P	D	%D	P	%P
Pp	6,4	0,0415 ^a	3,5	45,31	0,0045 ^b	89,16	2,8	56,25	0,001 ^b	97,35
Pc	2,6	0,029 ^a	2,3	11,54	0,019 ^b	34,48	2,0	23,07	0,005 ^b	82,75

incubação em BDA controle e testes; %D: porcentagem de inibição micelial; P: peso seco em gramas da colônia em mm após 7 dias de incubação em BDA controle e testes; %P: porcentagem de inibição do peso seco; Meio de cultura controle sem a adição (*) e com a adição (**) de CURC a 1% e 3%. Pp: *Penicillina panemun*; Pc: *Penicillium citrinum*; a, b: letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 5\%$) pelo teste t-Student.

Deste modo, observa-se que o crescimento micelial diminui à medida que a concentração do extrato aumenta. Os resultados mostram que não houve uma perda significativa do composto durante o processo de esterilização, podendo ser o composto responsável pela inibição dos isolados fúngicos.

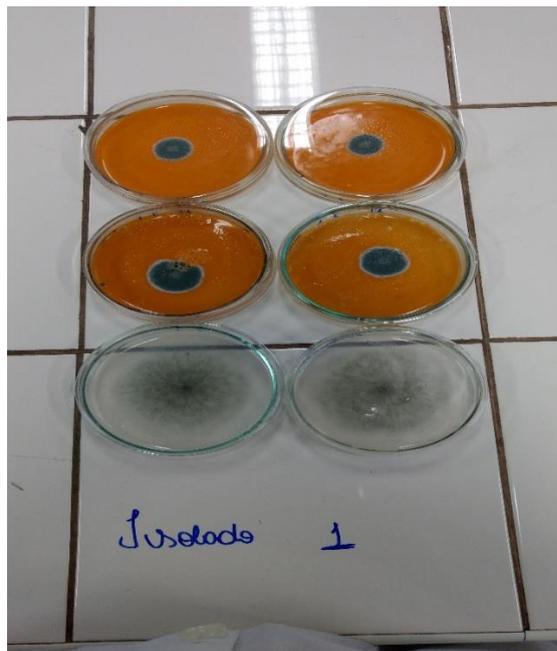


Figura 2. Isolado *Penicillium Paneum*

Segundo SILVA et al, (2008) extratos das plantas medicinais *Costus pisonis*, *Achillea millefolium* e *Plecthanthus barbatus* foram capazes de inibir o crescimento micelial de fungos fitopatogênicos do gênero *Colletotrichum*.

De acordo com SHELEF (1983) os condimentos vegetais como as ervas aromáticas afetam todas as fases do crescimento microbiano. A fase denominada lag é

prolongada a velocidade de crescimento e durante a fase log é reduzida, o número de células também é reduzido.

Estudos afirmam que, um dos principais componentes responsáveis pelo potencial terapêutico da cúrcuma é a curcumina, que por sua vez possui efeito antiinflamatório, antioxidante, antibacteriano e antifúngico. KIM et al., (2003) notou ao realizar pulverização em plantas com uma suspensão preparada com tween 80, água destilada e curcumina isolada, a mistura apresentou atividade antifúngica nas proporções de 85, 76 e 45% para os fungos *P. infestais*, *P. recôndita* e *R. solani* respectivamente.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se com este trabalho que, as concentrações de curcumina de 1 e 3% mostraram inibição fúngica diminuindo significativamente o crescimento das espécies de *Penicillium citrinum*, mas principalmente os de *Penicillium paneum*. Em nenhuma das concentrações testadas houve inibição total do crescimento micelial e peso seco dos fungos. Estudos futuros podem ser realizados em diferentes meios de concentrações e diretamente aplicado nos alimentos para verificar a capacidade de inibição da curcumina sobre os fungos. Se torna promissor o uso da curcumina no prolongamento da vida de prateleira de produtos de panificação.

RERERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, C. C. *et al.* **Antimicrobial action of the essential oil of lippia gracis schauer**. Brazilian archives and technology, 2006.

ALMEIDA, L. P. **Caracterização de pigmentos da *Cúrcuma longa L.*, avaliação da atividade antimicrobiana, morfogenese in vitro na produção de curcumanoídes e óleos essenciais**. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Ciência de Alimentos. Belo Horizonte: UFMG, 2006.

BHAVANISHANKAR, T. N.; MURTHY, S. V. Effect of turmeric fractions on the growth of some intestinal and pathogenic bacteria in vitro. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 17, p. 1363-1366, 1979.

CENTENO BS, CARRERA JASPE Y. Actividade antifúngica y antiaflatoxigénica de extractos de melissa officinalis (lamiaceae) sobre *Arpergillus flavus*. **Saber**, 25 (2): 185-192, 2013.

DAGNAS, S.; GOUGOULI, M.; ONNO, B.; KOUTSOUMANIS, P. K.; MEMBRÉ, J. M. Quantifying the effect of water activity and storage temperature on single spore lag times of three moulds isolated from spoiled bakery products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 240, p. 75-84, 2017.

Food And Indoor Fúngi. Utrecht: CBS, 2010.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2013.

FREIRE, F. A deterioração fungica de produtos de panificação no Brasil. **Comunicado Técnico/Embrapa Agroindustria Tropical**, 2011.

GONÇALEZ E, SILVA JL, REIS TA, NAKAI, VK, FELÍCIO JD, CORRÊA B. **Produção de aflotoxinas e ácido ciclopiazônico por cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de amendoim.** São Paulo: Arquivos do Instituto Biológico; 2013.

KIM, D. S. H. L.; PARK, S. Y.; KIM, J. Y. Curcuminoids from *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) that prote PC 12 rat pheochromocytoma and normal human umbilical vein endothelial cells from (beta) A (1-42) **Neuroscience Letters**, v. 303, p.57-61, 2001.

KIM, M. K.; CHOI, G. J.; LEE, H. S. **Fungicidal property of *Curcuma longa* L. rhizome-derived curcumin against phytopathogenic fungi in a greenhouse.**Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton, 2003.

LUTOMSKI, j.; KEDZIA, B.; DEBSKA, W. Effect of on alcohol extract and of active ingredients from *Curcuma longa* on bacteria and fungi. **Planta Medica**, v. 26, n. 1:9-19, 1974.

MACIEL, M. J.; PAIM, M. P.; CARVALHO, H. H. C.; WIEST, J. M. **Avaliação do extrato alcoólico de hibisco (*hibiscus sabdariffa* L.) como fator de proteção antibacteriana e antioxidante.** São Paulo: Adolf Lutz, 2012.

MALKKI, Y.: e RAVHA, O. Mold inhibition by aerosols. **Bakers Digest**, v 52, n. 1, p. 47-50,1978.

MARQUES, R. P.; MONTEIRO, A. C.; PEREIRA, G. T. **Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo de Nim (*Azadirachta indica*).** Ciência Rural, 2004.

MARTINS, M. C.; RUSIG, O. Cúrcuma - um corante natural. **Boletim da Sociedade Brasileira de Tecnologia em Alimentos**, v. 26, p. 53-65, 1992.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em toterapia no Nordeste do Brasil.** Fortaleza: Imprensa universitária UFC, 2000.

MEIRELES, F.; SREBERNICH, S. M. **Barra de cereal diet - controle microbiológico das melhores formulações obtidas através da metodologia de superfície de resposta**. Campinas: In XIII Encontro de Iniciação Científica da PUC, 2008.

MIDIO, A. F. **Toxicologia de alimentos**. São Paulo: livraria Varela, 2000.

NAGHETINI, C.C. **Caracterização físico-química e atividade antifúngica dos óleos essenciais da Cúrcuma**. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2006.

OLIVEIRA JN, OLIVEIRA AV, MENEGHELLO ER. **Análise Molecular de espécies de *Aspergillus* contaminantes de uvas vendidas no comércio de Maringa PR**. Iniciação científica CESUMAR. V. 15, n. 2, p. 157-163, jul/dez 2013.

PELCZR, M. J.; CHAN, E. C. S. KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. v. 1, ed. 2. São Paulo: MAKRON, 1996.

PITT, J. L. HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. Springer. 2009.

REIS, P. C. D. G. **Desenvolvimento, caracterização, atividade antimicrobiana e estabilidade de microcápsulas de oleorresina de cúrcuma**. Dissertação para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Goiás, 2013.

RHODEN, S. A.; GARCIA, A.; RUBIN FILHO, C. .; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Phylogenetic diversity of endophytic leaf fungus isolates from the medicinal tree *trichilia elegans* (Meliaceae). **Genet Mol Res**. v. 11, n. 3, p. 2513-2522, 2012.

SAMSON, R. A. FRISVAD, J. C. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: New taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites. **Studies in Mycology**. v. 49 p. 1-251. 2004.

SILVA, M.B.; NICOLI, A.; COSTA, A.S.V.; BRASILEIRO, B. G.; JAMAL, C.M.; SILVA, C.A.; PAULA JÚNIOR, T. J.; TEIXEIRA, H. Ação antimicrobiana de extratos de

pantas medicinais sobre espécies fitopatogênicas de fungos do gênero *Colletotrichum*. **Rev. Bras, PI. Med.**, Botucatu, v.10, n. 3, p.57-60, 2008.

SILVA, Sílvia Edna Rezende da. **Decomposição dos alimentos: ação dos micro-organismos**. 2012. 36 f. Monografia (Especialização) - Curso de Especialização em Educação: Métodos e Técnicas de Ensino, Pós Graduação, Universidade Tecnológica Federal do Paraná- UFPR- Campus Medianeira, Medianeira, 2012.

SOUZA, A. L.; DIAS, L. P.; CARDOSO, J. R.; NASCIMENTO, V. L.V. **Bioatividade do extrato aquoso do açafrão (*Curcuma longa L.*) sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum***. Teresina: IFAL, 2010.

SREEJAYAN, Rao MN. Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation. **J Pharm Pharmacol**.Dec;46(12):1013-6. 1994.

TIAN, J. *et al.* **In vitro and in vivo activity of essential oil from dill (*Anethum geaneolensi*) against fungal spoilage of cherry tomatoes**. Food microbiology, 2011.

VILELA, C. A. A.; ARTUR, P. O. **Secagem do açafrão (*Curcuma Longa L.*) em diferentes cortes geométricos**. Campinas: Ciência e tecnologia de alimentos, 2008.
VILJOEN, C. R.; VON HOLY, A. Microbial populations associated with commercial bread production. **Journal of Basic Microbiology**. v. 37, n. 6, p. 439-444, 1997.

WHITE, T. J.; BRUNS, T. LEE, S. J. W. T.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

XAVIER, Rafaela Nemer. **Convivendo com o inimigo: cozinha domiciliar e riscos de contaminação alimentar**. 2009. 42 f. Monografia (Especialização) - Curso de Qualidade em Alimentos, Universidade de Brasília. Centro de Excelência em Turismo- CET, Brasília, 2009.