

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

SUELLEN APARECIDA DA SILVA

**POTENCIAL DE AÇÃO INIBITORIA DA CURCUMINA SOBRE O
FUNGO *CLADOSPORIUM SP***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2018

SUELLEN APARECIDA DA SILVA

POTENCIAL DE AÇÃO INIBITORIA DA CURCUMINA SOBRE O FUNGO *CLADOSPORIUM SP*

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 – DALIM – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Campus Campo Mourão, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos.

Orientadora: Prof^o. Dra. Márcia Regina Ferreira Geraldo Perdoncini.

CAMPO MOURÃO

2018

TERMO DE APROVAÇÃO

POTENCIAL DE AÇÃO INIBITORIA DA CURCUMINA SOBRE O FUNGO *CLADOSPORIUM SP*

Por

SUELLEN APARECIDA DA SILVA

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 15 de junho de 2018 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

Profª Idinea Fernandes dos Santos Pereira
Membro da banca

Profª Franciele Leila Giopato Viell
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, eu agradeço a Deus por ter me dado saúde, e força para superar todas as dificuldades e conseguir chegar até aqui, permitindo-me viver esse momento, trazendo alegria aos meus pais e a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço também a minha orientadora Prof^a. Dr^a. Márcia Regina Ferreira Geraldo Perdoncini pela oportunidade, paciência, compreensão e dedicação, obrigado por estar sempre disponível e por me ensinar parte do seu conhecimento, contribuindo para meu crescimento profissional. Também quero agradecer o professor Odinei por ter cedido a curcumina para poder realizar este trabalho.

Aos meus pais Dalva M^a Paulino da Silva e Dejair Paulino da Silva, agradeço pelo apoio e incentivo, e também agradeço minha Irmã Michelly Paulino da Silva e amigos pelos incentivos e puxões de orelhas, e pela confiança que ia dar tudo certo.

Agradeço também aos professores membros da banca, pelos ensinamentos e também pelas correções e sugestões apresentadas. E a todos os professores que tive a oportunidade de conhecer durante o tempo que estive na UTFPR, que compartilharam de seus conhecimentos, contribuindo não apenas com meu crescimento profissional, mas também com meu crescimento pessoal.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

RESUMO

SILVA, S. A. **Potencial de ação inibitória da curcumina sobre o fungo *Cladosporium* sp.** 2018. 27 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal Do Paraná (UTFPR). Campo Mourão, 2018.

A curcumina é um composto fenólico natural, com pigmentação amarela, que é extraído de condimentos como o açafrão-da-terra (*Curcuma longa*), apresentando uma série de efeitos farmacológicos interessantes, como atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante. Entretanto, é seu caráter antimicrobiano que desperta o interesse na indústria de alimentos, pois a contaminação e deterioração por microrganismos ainda é um problema preocupante, apesar dos vários métodos de conservação disponíveis. Diante disso, o presente trabalho objetiva a avaliação do potencial de inibição da curcumina sobre o crescimento do fungo *Cladosporium* sp. Foram adicionadas concentrações de 1 e 3% de curcumina no meio de crescimento dos fungos, utilizando como controle um meio sem adição de curcumina. A utilização deste composto natural demonstrou diminuição no crescimento dos fungos *Cladosporium oxysporum* e *Cladosporium subuliforme*, apresentando inibição significativa de acordo com as diferentes concentrações de curcumina utilizadas.

Palavras-chave: *Curcuma longa*; Composto natural; CIM; Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

SILVA, S. A. **Potential inhibitory action of curcumin on the fungus *Cladosporium* sp.** 2018. 27 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal Do Paraná (UTFPR). Campo Mourão, 2018.

Curcumin is a natural phenolic compound with yellow pigmentation, which is extracted from condiments such as turmeric (*Curcuma longa*), presenting a series of interesting pharmacological effects, such as inflammatory activity, antimicrobial and Antioxidant. However, it is its antimicrobial character that arouses interest in the food industry because contamination and deterioration by micro-organisms is still a troubling problem despite the various methods of conservation available. Given this, the present work aims to assess the potential for inhibition of curcumin on the growth of the *Cladosporium* sp fungus. Concentrations of 1 and 3% of curcumin were added in the fungus growth medium, using a medium without addition of curcumin. The use of this natural compound demonstrated a decrease in the growth of fungi *Cladosporium oxysporum* and *Cladosporium Subuliforme*, presenting significant inhibition according to the different concentrations of curcumin used.

Key words: *Curcuma longa*; Natural compound; MIC; Antimicrobial activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	20
Gráfico 1. Crescimento micelial do isolado <i>Cladosporium oxysporum</i> ao longo dos dias.....	22
Gráfico 2. Crescimento micelial do isolado <i>Cladosporium subuliforme</i> ao longo dos dias.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM).....	23
Tabela 2. Resultados obtidos pela avaliação do diâmetro micelial e peso seco.....	24

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	11
2.1	OBJETIVO GERAL	11
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1	CURCUMINA	12
3.2	FUNGO <i>Cladosporium</i> sp.	12
3.3	FUNGO <i>Cladosporium oxysporum</i>	14
3.4	FUNGO <i>Cladosporium subuliforme</i>	14
4	MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1	LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO	16
4.2	MATÉRIA-PRIMA	16
4.3	MICRO-ORGANISMO	16
4.3.1	Identificação molecular dos fungos baseado no seqüenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2	16
4.4	MATERIAIS E PREPARO DO MEIO DE CULTURA	17
4.4.1	Preparo dos meios de cultura	18
4.5	MÉTODOS	19
4.5.1	Verificação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) da curcumina	19
4.5.2	Verificação da ação da curcumina sobre o crescimento micelial e peso seco	20
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1 INTRODUÇÃO

Os fungos são conhecidos popularmente como mofos e bolores. No entanto, na maior parte das vezes, são lembrados somente pelos danos que algumas espécies causam, seja parasitando plantas ou causando problemas de saúde como alergias e micoses em animais (SILVA; COELHO, 2006). Os fungos são disseminados no ambiente por meio dos esporos ou fragmentos de hifas, que se dispersam na natureza através de vias como a água, os animais, as sementes, os insetos e principalmente através do vento, neste último caso denominado de fungos anemófilos (SILVEIRA, 1995; MEZZARI *et al.*, 2003).

De acordo com Lacaz *et al.*(2002) dentre os principais gêneros de fungos anemófilos amplamente distribuídos no ar e na poeira, o gênero *Cladosporium* sp, apresenta maior incidência com relação ao demais. Está classificado por Prince e Meyer (1976) apud Pereira (2007), como um fungo dominante universal, ou seja, encontrados em praticamente todos os locais pesquisados. Em sua maioria contém espécies saprófitas, mas incluem também espécies responsáveis por doenças graves em plantas, animais e humanos, como no caso dos anemófilos reportados como bioalérgeno (LACAZ *et al.*, 2002).

O fungo *Cladosporium* sp apresenta uma morfologia de colônias efusas ou ocasionalmente puntiformes, possuem coloração muitas vezes olivácea podendo ser também acinzentadas à marron escuro. A sua superfície pode ter aparência de pêlos ou flocosa, e seu micélio é imerso ou na maior parte das vezes superficial. Os conídios podem ser produzidos em cadeias, sendo catenulados, as vezes solitários em algumas espécies, onde os conídios são mais largos e algumas vezes são ramificados em cadeia acropeurógena. São simples, cilíndricos, ovóides, coliformes, fusiformes, elipsóides, esféricos ou sub esféricos.

As espécies de *Cladosporium* sp são raramente patogênicas aos seres humanos, mas já foram relatados em infecções de pele e das unhas dos pés, sinusite e infecções pulmonares. Estas doenças, se não forem tratadas, podem gerar problemas respiratórios (RIVAS; THOMAS, 2005).

Os fungos podem causar grandes prejuízos no campo, causando deterioração dos alimentos. Assim, o gênero *Cladosporium* sp, por sua vez, é comum em sementes durante o armazenamento podendo causar prejuízos na germinação e no

vigor, quando as mesmas não são tratadas (ITO *et al.*, 2003; ZUCCHI e MELO, 2009). Provocam manchas no tegumento, resultando em um aspecto indesejável, e com isso acaba resultando em perdas na colheita. Podem ser patogênicos em frutos e grãos, atacando tecidos novos de folhas, galhos, flores e frutos, causando necrose no local infectado, provocando grandes danos pós-colheita.

Uma das principais causas de perdas dos alimentos é a deterioração, que além de causar diminuição da produtividade podem causar danos à saúde do homem. O uso de aditivos tem sido efetivo na prevenção da deterioração de alimentos (ALMEIDA *et al.*, 2008).

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

Existe um interesse que vem crescendo na exploração comercial da curcumina para a indústrias, por apresentar várias atividades, dentre elas a antifúngica. O consumo da curcumina é considerado seguro quando se emprega como aditivo alimentar (VOLP *et al.*, 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 (NEGUETINI, 2006). Desta forma o objetivo deste trabalho foi analisar o potencial de inibição da curcumina sobre o crescimento do fungo *Cladosporium* sp.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da curcumina frente ao fungo *Cladosporium* sp.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar o fungo em BDA;
- Determinar a concentração inibitória mínima e a concentração fungicida mínima da curcumina sobre o fungo *Cladosporium* sp;
- Verificar a inibição do crescimento micelial e peso seco do fungo *Cladosporium* sp frente a curcumina.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CURCUMINA

A curcumina é o componente majoritário dos rizomas de *Curcuma longa*, sendo responsável por cerca de 2% do peso seco dos rizomas (SANTIAGO *et al.*, 2015). O principal componente extraído é a curcumina, pigmento de tom amarelo limão brilhante a alaranjado também responsável por ações bioativas (VOLP *et al.*, 2009). A curcumina é considerado um aditivo que tem baixa solubilidade em água, e é solúvel em soluções aquosas básicas, e nestes casos a solução apresenta coloração avermelhada.

A principal utilização da substância da curcumina é na culinária, como componente açafrão da Índia, e um dos maiores problemas da curcumina ser utilizada é devida sua baixa biodisponibilidade, pois ela é insolúvel em água. No momento até o presente estudo a curcumina não apresenta toxicidade em homens e animais, mesmo quando ela é utilizada em doses até 12 g ao dia (SANTIAGO *et al.*, 2015).

A curcumina é classificado pela União Europeia como o primeiro corante (E100) da listas de aditivos permitidos, pois a curcumina tem uma intensa absorção na região do visível, o que justifica a utilização desta como corante alimentício.

Existe um interesse que vem crescendo na exploração comercial da curcumina para a indústria, por apresentar várias atividades, como a de aditivo alimentar e também como ação antifúngica. O consumo da curcumina é considerado seguro quando se emprega como aditivo alimentar (VOLP *et al.*, 2009).

3.2 FUNGO *Cladosporium* sp.

Os fungos estão amplamente distribuídos na natureza e são contaminantes comuns de alimentos, como grãos e rações, que por apresentarem nutrientes como carboidratos, proteínas e lipídeos constituem um substrato adequado para o desenvolvimento de microrganismos. Eles são organismos eucarióticos que

possuem grande capacidade de adaptação e crescimento sob condições de umidade e temperatura extremamente variáveis.

O gênero *Cladosporium*, criado por Link, em 1816, é um dos maiores e mais heterogêneos gêneros de *Hyphomycetes* (DUGAN; SCHUBERT; BRAUN, 2004). Esse gênero abrange muitas espécies de fungos contaminantes e oportunistas dematiáceos, normalmente identificados como contaminantes do ar e encontrados como saprófitas no solo e em materiais em decomposição, principalmente folhas e hastes vegetais (ZALAR *et al.*, 2007).

Os fungos podem causar grandes prejuízos no campo, causando deterioração dos alimentos. Assim, o gênero *Cladosporium* sp, por sua vez, é comum em sementes durante o armazenamento podendo causar prejuízos na germinação e no vigor, quando as mesmas não são tratadas (ITO *et al.*, 2003; ZUCCHI e MELO, 2009).

O fungo *Cladosporium* sp apresenta uma morfologia de colônias efusas ou ocasionalmente puntiformes, possuem coloração muitas vezes olivácea podendo ser também acinzentadas à marrom escuro. Os membros do gênero *Cladosporium* sp ocorrem em produtos de vegetais em decomposição e também no solo. Como contaminantes dos meios de cultura, formam colônias discretas, com o desenvolvimento espesso e aveludado de micélios verde-oliva escuro (DORNELLAS, 2016).

As espécies desse gênero apresentam colônias grandes com crescimento demorado, é encontrado em todo o mundo, a maioria das espécies são patógenas, mas raramente patogênicas aos seres humanos mas já foram relatados em infecções de pele e das unhas dos pés, sinusite e infecções pulmonares, esses fungos são frequentemente encontrados em alimentos, geralmente crescem em uma temperatura de 22-25°C em torno de 7 dias (SAMSON *et al.*, 2010).

Este gênero compreende mais de 189 espécies, com uma distribuição mundial, estando entre os fungos mais comumente isolados do ambiente em quase todo lugar do mundo, podendo ser isolado a partir de praticamente qualquer fonte ambiental e localização geográfica (CROUS *et al.*, 2014; BENSCH *et al.*, 2012, 2015).

3.3 FUNGO *Cladosporium oxysporum*

Espécies de *Cladosporium* são amplamente distribuídos no ar, ocorrendo como saprófitas comuns no solo ou matéria orgânica. Algumas são patógenos vegetais, enquanto outros são ocasionais agentes de infecções humanas.

O fungo *Cladosporium oxysporum* é um fungo que frequentemente cresce em vários substratos. Esta espécie é muitas vezes encontrada como contaminantes da culturas vegetais (ZHENG *et al.*, 2014) e citada em casos de doença cutânea e subcutânea (ROMANO *et al.*, 1999; GUGNANI *et al.*, 2006).

O *Cladosporium oxysporum* ocorre como uma saprófita em climas mornos. É um agente etiológico muito raro de phaeohyphomycosis cutânea e ceratite, que é uma doença cutânea e subcutânea que ocorre geralmente em partes expostas do corpo após uma lesão, e o fungo se implanta na ferida aberta.

Suas características em cultura em PDA sua colônia atinge 68-78 mm de diâmetro após 14 dias, em MEA atinge 58-70 mm, e em OA as colônias atingem 53-62 mm após 14 dias.

O fungo *Cladosporium oxysporum* é formado por um micélio interno e superficial, suas hifas são levemente ramificadas e septadas, de coloração oliva pálido e mais escuro, e para a base dos conidióforos, médio oliva-marrom. As características da colônia são aveludadas e muitas vezes flocosas no centro, na coloração a verde-oliva, preto-verde, com conidióforos retos ou ligeiramente flexíveis, na cor verde pálido ao marrom, e seus conídios esféricos a sub esféricos.

O fungo *oxysporum* é encontrado no ar, no solo, em partes mortas de folhas, caules de plantas herbáceas, e também em materiais orgânicos. Esse fungo é de uma espécie comum nos trópicos e subtropicais em partes mortas de folhas, e também age como um invasor secundário em lesões de plantas necrosadas.

3.4 FUNGO *Cladosporium subuliforme*

O fungo *Cladosporium subuliforme* é uma fungo encontrado amplamente na natureza, sendo não patogênico e patogênico. O *Cladosporium subuliforme* são agentes de causas de mancha de foliar em nogueira-peça, sendo patogênico a esses cultivares (WALKER,2016). Ele é formado por um micélio interno e superficial,

suas hifas ramificam-se de forma moderada de 1 a 4 μm de largura, são septadas na cor pálida ao oliva, e seus conídios macro, semi-macro ou micro macro, solitários ou em pares, com hifas ereta, reto e na maior parte flexível (BENSCH *et al.*, 2018).

Suas características de cultura em PDA, suas colônias são cinza ao oliva, aveludada flocosa e macia, suas margens são cinzas para o branco, com seu micélio aéreo abundante.

Suas colônias em MEA, na cor oliva esverdeado, flocoso e macio, com seu micélio abundante macio principalmente no centro da colônia. E as colônias em AO, suas culturas são esbranquiçadas ao cinza e oliva cinzento, e suas margens verde marcante. O *Cladosporim subuliforme* é um fungo encontrado no are pode ser encontrado em folhas e caules de árvores.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO

O estudo foi realizado no Laboratório de Apoio e de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), *Campus* Campo Mourão.

4.2 MATÉRIA-PRIMA

Padrão de Curcumina (Suspensão à 20%).

4.3 MICRO-ORGANISMO

Foram isolados duas espécies do gênero *Cladosporium* em pães deteriorados, e foi utilizado nesse trabalho, o *Cladosporium oxysporum* e *Cladosporium subuliforme*.

Esses fungos foram isolados a partir de pães de forma tradicional e integral, que foram cedidos pela indústria de pães congelados e assados da 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 na Universidade Estadual de Maringá - UEM para identificação molecular.

4.3.1 Identificação molecular dos fungos baseado no seqüenciamento 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 do

fabricante, com exceção da fase inicial, onde os fungos foram cultivados 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 comparadas 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 E PREPARO DO MEIO DE CULTURA

Foram utilizados meios de cultura, balança analítica, utensílios para a pesagem na preparação dos meios de cultura, placas de Petri, estufa de cultura (marca Fanem LTDA), câmara de fluxo laminar (marca Bio Seg), autoclave Vertical (marca Ploenix) e microscópio. Os meios de culturas utilizados foram: BDA (ágar batata dextrose) da Kasvi Laboratories, MEA (ágar extrato de malte) da Kasvi Laboratories, ASD (ágar Sabouraud Dextrose) da Biomark Laboratories Pune 411041 India e RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium).

4.4.1 Preparo dos meios de cultura

O meio RPMI-1640 foi utilizado para o teste da concentração inibitória, é um meio completamente 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 0,165mol/L), agitando até dissolver. Durante a homogeneização o pH foi ajustado para 7,0 a 25°C usando hidróxido de sódio 1mol/L. Foi acrescentado água adicional para levar o meio a um volume final de 1L. 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 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 teste. Os meios sem a curcumina foram utilizados como meio controle. Após a esterilização, os meios foram vertidos em placas de Petri estéreis.













4.5 MÉTODOS

4.5.1 Verificação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) da curcumina

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), o procedimento foi realizado de acordo com o documento da CLSI, Norma M38 A (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. O inóculo fúngico foi previamente preparado a partir do recolhimento dos conídeos após sete dias de crescimento do fungo em BDA e padronizados à 10^4 conídeos/ml, através de contagem em câmara de Neubauer e diluição.

Foi utilizados 12 tubos, onde dos tubos do 2 ao 10 e 12 (controle positivo) serão adicionados 500µl do meio RPMI. Nos tubos 1, 2 e 11 (controle negativo) será adicionados 500µl de suspensão de curcumina à 20%. A partir do tubo 2, foi realizada uma diluição seriada 1:2 até o tubo 10, transferindo 500µl para cada tubo teste e ao final desprezando 500µl do tubo 10. Após, será adicionado 500µl do inóculo a 10^4 conídios/ml nos tubos testes (1 a 10) e controle positivo (12), reduzindo a concentração da curcumina em cada tubo pela metade. Os tubos foram agitados levemente para ter o conteúdo homogeneizado, e armazenados em estufas a 35 °C por 48 horas. Após esse período, foi verificado o crescimento através da turvação do meio ou pela observação ao microscópio estereoscópio. Foi considerada CIM, a menor concentração em que a curcumina impedir o crescimento visível do inóculo em teste.

Figura 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM)

											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	500µl do meio RPMI	500µl do meio RPMI	500µl do meio RPMI	500µl do meio RPMI	500µl do meio RPMI	500µl do meio RPMI	500µl do meio RPMI	500µl do meio RPMI	500µl do meio RPMI		500µl do meio RPMI (controle positivo)
500µl de suspensão da curcumina 20%	500µl de suspensão da curcumina 20%										500µl de suspensão da curcumina 20% (controle negativo)
	Diluição 1:2	Diluição 1:2	Diluição 1:2	Diluição 1:2	Diluição 1:2	Diluição 1:2	Diluição 1:2	Diluição 1:2	Diluição 1:2 (Desprezar)		
500µl conídios 10 4/ml	500µl conídios 10 4/ml	500µl conídios 10 4/ml	500µl conídios 10 4/ml	500µl conídios 10 4/ml	500µl conídios 10 4/ml	500µl conídios 10 4/ml	500µl conídios 10 4/ml	500µl conídios 10 4/ml	500µl conídios 10 4/ml	500µl conídios 10 4/ml	500µl conídios 10 4/ml

4.5.2 Verificação da ação da curcumina sobre o crescimento micelial e peso seco

Para avaliação da atividade da curcumina contra o crescimento micelial e peso seco, foi utilizada a técnica descrita por Marques *et al.*(2004) com algumas modificações descritas a seguir. O diâmetro da colônia foi medido através de medidas em milímetros de dois diâmetros de cada colônia crescidas nos meios teste e controle, no oitavo dia de incubação.

A curcumina foi adicionada em diferentes concentrações no meio, e estes foram os meios testes. As concentrações foram escolhidas de acordo com resultados prévios da concentração inibitória mínima (CIM) para cada isolado. Como controle foi utilizado meio sem adição de curcumina. Os fungos isolados foram pré-incubados em BDA por sete dias a 25°C em estufa. A partir destas colônias foram retirados plugs com o auxílio de um anel metálico esterilizado de 5mm de diâmetro e inoculados em placas de Petri com os meios controle e testes. Para a verificação do diâmetro das colônias, foram inoculados os isolados fúngicos nos meios controle e testes em estufa a 25°C por oito dias. Logo após, foi determinado o diâmetro da colônia através de medidas em milímetros de dois diâmetros de cada colônia, no oitavo dia de incubação.

A determinação do peso seco foi feita após oito dias de incubação dos isolados a 25°C nos meios controle e testes. Para isso o micélio foi retirado do meio liquefeito, com o auxílio de uma pinça e colocado em papel de filtro previamente pesado. Os papéis com o micélio foram levados à estufa a 70°C e após 72 horas foi pesado diariamente até atingir o peso constante.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 mostra que, para *Cladosporium oxysporum*, a CIM foi de 2,5% e, para *Cladosporium subuliforme*, foi 0,63% de curcumina utilizada.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM)

<i>Cladosporium oxysporum</i>	Crescimento fúngico	<i>Cladosporium subuliforme</i>	Crescimento fúngico
Tubo 12	+	Tubo 12	+
Tubo 11	-	Tubo 11	-
Tubo 10	+	Tubo 10	+
Tubo 9	+	Tubo 9	+
Tubo 8	+	Tubo 8	+
Tubo 7	+	Tubo 7	+
Tubo 6	+	Tubo 6	+
Tubo 5	+	Tubo 5	-
Tubo 4	+	Tubo 4	-
Tubo 3	-	Tubo 3	-
Tubo 2	-	Tubo 2	-
Tubo 1	-	Tubo 1	-

Tubos que não apresentaram crescimento fúngico (-) e tubos que apresentaram crescimento fúngico(+)

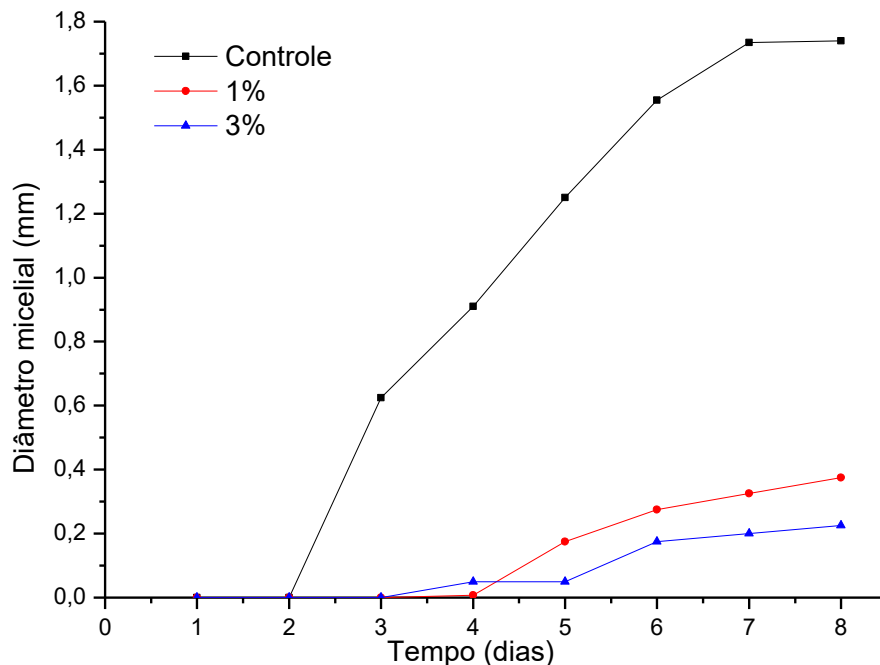
Na tabela 2, podemos observar os resultados obtidos durante a avaliação do diâmetro micelial e o peso seco avaliado no oitavo dia. Foi possível observar que em relação ao diâmetro micelial do *Cladosporium oxysporium* houve diferença significativa entre o controle e as concentrações de 1 e 3 % e o *Cladoporium subuliforme* não teve diferença entre controle e 1%, mas tendo uma diferença entre contole e 3% de curcumina. Em relação ao peso seco não houve diferença significativa para *C. oxysporum*, porém para *C.subuliforme* a concentração mais efetiva foi de 3%.

Tabela 2. Resultados obtidos pela avaliação do diâmetro micelial e peso seco

AMOSTRA	<i>Cladosporiumoxyporum</i>		<i>Cladosporiumsubuliforme</i>	
	DM (mm)	PMS(g)	DM (mm)	PMS (g)
Controle	1,740 ^a ± 0,707	0,056 ^a ± 0,018	1,400 ^a ± 0,050	0,022 ^a ± 0,001
1%	0,375 ^b ± 0,177	0,003 ^a ± 0,000	1,050 ^{ab} ± 0,050	0,015 ^b ± 0,001
3%	0,225 ^b ± 0,106	0,006 ^a ± 0,001	0,925 ^b ± 0,075	0,008 ^c ± 0,001

Controle: meio de controle sem adição de curcumina; 1%: meio de cultura com adição de 1% de curcumina; 3%: meio de cultura com adição de 3% de curcumina; DM: diâmetro micelial; PMS: Peso micelial seco. Os dados são a média ± o desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 5\%$) pelo teste Tukey.

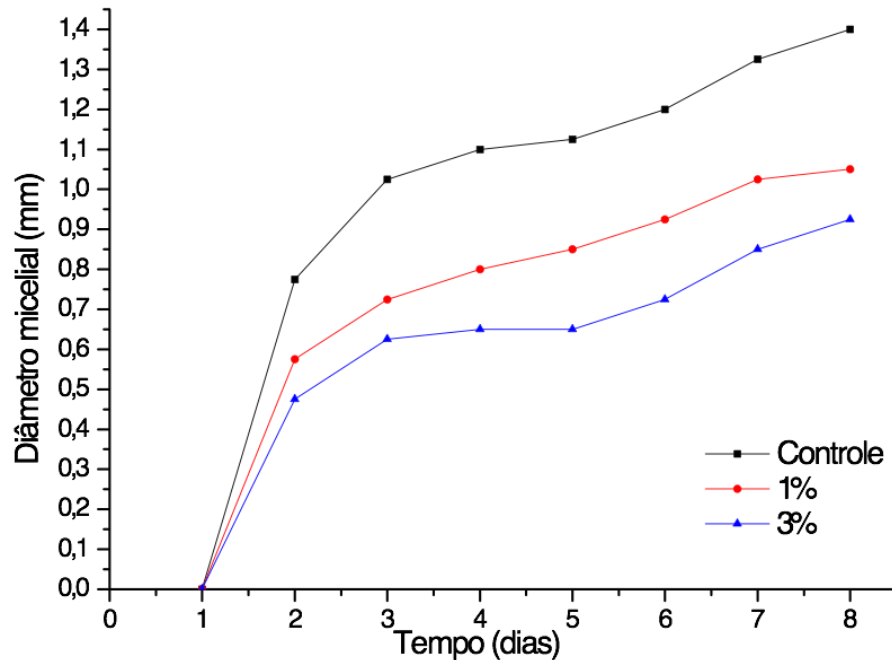
O gráfico 1 mostra o crescimento do fungo *Cladosporium oxysporum* através do diâmetro micelial até o oitavo dia. O controle inicia o crescimento a partir do segundo dia, enquanto que os meios com 1% e 3% de curcumina têm crescimento iniciado a partir do terceiro dia de incubação.

Gráfico 1. Crescimento micelial do isolado *Cladosporium oxysporum* ao longo dos dias

O gráfico 2 mostra o crescimento do diâmetro micelial do *Cladosporium subuliforme* até o oitavo dia de incubação. O controle, que foi o meio de cultura sem adição de curcumina, mostra um crescimento a partir do primeiro dia de incubação e

os com adição de 1% e 3% também. Mas os resultados tiveram resultados satisfatórios se diferenciando entre si.

Gráfico 2. Crescimento micelial do isolado *Cladosporium subuliforme* ao longo dos dias.



Deste modo, observou-se que o crescimento dos fungos utilizados diminuiu entre as diferentes concentrações utilizadas. Os resultados obtidos mostram que houve uma inibição significativa entre as porcentagens de 1 e 3%, mostrando que a curcumina possui efeito antifúngico nos fungos utilizados neste trabalho.

Estudos mostram que a curcumina apresenta atividade antimicrobiana em testes *in vitro* sendo de interesse para a área de alimentos (NEGUETINI, 2006), confirmando os resultados encontrados neste trabalho.

A curcumina é um composto fenólico natural isolado a partir do rizoma do açafrão da Índia (*Curcuma longa*) que apresenta uma série de propriedades biológicas, e 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).

O que pode dificultar o uso da curcumina é a sua baixa biodisponibilidade, devido à insolubilidade em água, porém pode ser usada como aditivo alimentar e na culinária (VOLP et al., 2009).

Como existe um grande interesse de produtos naturais na indústria de alimentos, a curcumina se encaixa como um aditivo alimentar por apresentar várias atividades, dentre elas a antifúngica.

CONCLUSÃO

Conclui-se com este trabalho que as concentrações de 1% e 3% de curcumina mostraram inibição significativa para *Cladosporium oxysporum* e 3% para *Cladosporium subuliforme* em relação ao crescimento micelial. Em relação ao peso seco não houve diferença significativa para *Cladosporium oxysporum* enquanto que para *Cladosporium subuliforme* todas as concentrações apresentaram uma diminuição dos valores em relação ao controle. Em nenhuma das concentrações testadas nas placas houve inibição total dos fungos. Estudos futuros podem ser realizados em diferentes meios e concentrações e diretamente nos alimentos, para verificar a capacidade de inibição da curcumina sobre os fungos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, L. P. NAGHETINI, C. C.; NUNAN, E. A. **Atividade antimicrobiana *in vitro* do rizoma em pó, dos pigmentos curcuminóides dos óleos e dos essenciais da *Curcuma longa* L.** Ciência e agrotecnologia, Lavras, 2008.
- CROUS, P. W.; SHIVAS, R. G.; QUAEDVLIEG, W. Fungal Planet description sheets:214–280. *Persoonia*, 32, p.184–306, 2014
- DA SILVA, F. Pereira. **Sazonalidade de *Cladosporium* sp. (fungo anemófilo) na cidade de Tangará da Serra-MT em função dos fatores ambientais no período de um ano.** Anais da 2ª Jornada Científica da Unemat. Barra do Bugres, Mato Grosso, 2009.
- DORNELLAS, Fernanda de Castro. **Atividade antifúngica de *Cúrcuma longa* L. (Zingiberaceae) contra fungos deteriorantes de pães.** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2016.
- DUGAN, F. M.; SCHUBERT, K.; BRAUN, U. Check-list of *Cladosporium* names. **Food And Indoor Fúngi.** Utrecht: CBS, 2010.
- GUGNANI, H.C.; RAMESH, V.; SOOD, N.; GUARRO, J.; MOIN-UL-HAQ; PALIWALJOSHI, A.; SINGH, B. **Cutaneous phaeohyphomycosis caused by *Cladosporium oxysporum* and its treatment with potassium iodide.** *Medical Mycology*, 44(3): 285-288, 2006.
- 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.
- LACAZ, C. S; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; VACCARI, E. M. H.; MELO, N. T. **Tratado de micologia médica.** 9ª ed. São Paulo. Sarvier, 2002.
- MARINO, R. H.; MESQUITA, J. B.; ANDRADE, K. V. S. **Incidência de fungos em sementes de *Phaseolus vulgaris* L. provenientes do Estado de Sergipe.** *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v.3, p.26-30, 2009.
- MELO, Carlos Lásaro Pereira. **Linhagens de feijão do cruzamento 'OuroNegro'x'Pérola' com características agrônômicas favoráveis.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, n. 11, p. 1593-1598, 2006.
- MEZZARI, Adelina. **Os fungos anemófilos e sensibilização em indivíduos atópicos em Porto Alegre, RS.** *Rev. Assoc. Med. Bras*, v. 49, n. 3, p. 270-3, 2003.
- PIMENTEL, L. D.; **Seleção de progênies de maracujazeiro amarelos vigorosos e resistentes à verrugose (*Cladosporium cladosporioides*).** *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal-SP, vol. 26, n. 2, p. 272-275, Agosto 2004.
- NEGUETINI, Cristina da Cunha. **Caracterização físico-química e atividade antifúngica dos óleos essenciais da cúrcuma.** 61 f. Dissertação (Mestrado) -

Curso de Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Fácacia da Universidade Federal de Minas Gerais. Ufmg, Belo Horizonte, 2006.

PAZ LIMA, MILTON. **Aspectos gerias e morfológicos do fungo *Cladosporium* sp.** Disponível em: <http://fitopatologia1.blogspot.com.br/2010/04/aspectos-gerais-e-morfologicos-do-fungo_6780.html> Acesso em: 29 Out.2016.

RIVAS, S. THOMAS. C.M. **As interações Molecular entre o tomate e a folha moldam o pathogen: Fulvum do *Cladosporium*.** Revisão anual de Phytopathology 43: 395-436. Disponível em: <<http://www.worldlingo.com/ma/enwiki/pt/Cladosporium,2005>>.

ROMANO, C.; BILENCI, R.; ALESSANDRINI, C.; MIRACCO, C. Case Report. **Cutaneous phaeohyphomycosis caused by *Cladosporium oxysporum*.** Mycosis, 42(1-2): 111-115, 1999.

SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J.; THRANE, U.; FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B. *Schlechtendalia*,v.11, p.1–103, 2004.

SILVA, R. R. da; COELHO, G. D. **Fungos: Principais grupos e aplicações biotecnológicas.** Curso de capacitação de monitores e educadores. Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. São Paulo, 2006.

BENSCH, K.; *et al.*Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (*Davidiellaceae*, *Capnodiales*). 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166061614600270>>.

SUETH-SANTIAGO, V. *et al.* Curcumina, o pó dourado do açafrão-da-terra: introspecções sobre química e atividades biológicas. **Química Nova**, v. 38, n. 4, p. 538-552, 2015.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. **Pigmentos naturais bioativos.**Alim. Nutri, Araraquara. v. 20, n. 1, p. 157-166, jan/mar.2009.

WALKER, Clair *et al.* **Identificação de espécies de *Cladosporium* e a reação de cultivares de noqueira-pecã.** Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria, 2016.

ZALAR, P.; DE HOOG, G.; SCHROERS, H.; CROUS, P.; GROENEWALD, J.; GUNDE - CIMERMAN, N. **Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporiums phaeospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments.** Studies in Mycology, v. 58, p.157 – 183, 2007.