

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E BIOMEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS APLICADAS À
FARMÁCIA

FLAVIO DIAS FERREIRA

Efeito inibitório do óleo essencial de *Curcuma longa* L. e curcumina na
produção de aflatoxinas

Maringá
2010

FLAVIO DIAS FERREIRA

Efeito inibitório do óleo essencial de *Curcuma longa* L. e curcumina na
produção de aflatoxinas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Machinski Junior

Maringá
2010

FOLHA DE AVALIAÇÃO

FLAVIO DIAS FERREIRA

Efeito inibitório do óleo essencial de *Curcuma longa* L. e curcumina na produção de aflatoxinas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Miguel Machinski Junior
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Eduardo Micotti da Glória
Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP

Prof. Dr. Carlos Kemmelmeier
Universidade Estadual de Maringá

Profª Drª Terezinha Inez Estivalet Svidzinski
Universidade Estadual de Maringá

DEDICATÓRIA

*A Deus, aos meus pais,
familiares e amigos...*

*Aqueles que fazem parte de
minha história de vida!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente e grandiosamente a Deus, pois com certeza sem ele não estaria aqui e nem teria chegado onde estou.

Aos meus pais, Oséas Fernandes Ferreira e Marisa Castilho Dias Ferreira, que em todos os momentos estiveram ao meu lado, nos momentos que necessitaram abraçar, apoiar e me levantar.

A minha irmã Francine Maery Dias Ferreira que participou desta caminhada e me ajudou a alcançar tal objetivo.

A minha noiva Raquel Balestri Heleno, por estar sempre ao meu lado, ajudando e apoiando incondicionalmente nas horas que mais precisava.

A Carla Cristina Arroiteia e Érika Bando, que estavam sempre presentes, para aconselhar, ensinar qual o caminho e a linha correta a percorrer para chegar ao destino tão esperado.

Aos mestres, Professores Doutores Miguel Machinski Junior e Carlos Kemmelmeier, pois mestres não são os que ensinam fórmulas, regras, raciocínios, mas os que questionam e despertam para a realidade. Não são aqueles que dão de seu saber, mas aqueles que fazem germinar o saber dos discípulos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia e em especial a Ilustríssima Professora Doutora Terezinha Inez Estivalet Svidzinski pela oportunidade.

Agradeço a todos os meus colegas do Laboratório de Toxicologia – DBS, que colaboraram direta ou indiretamente nesta pesquisa e, ao laboratório de Química e Fisiologia de Microorganismos – DBQ, pois sem este a pesquisa seria inviabilizada.

A todos, Muito Obrigado!

EPÍGRAFE

*“A vida sem ciência é uma
espécie de morte”.*

Sócrates

Efeito inibitório do óleo essencial de *Curcuma longa* L. e curcumina na produção de aflatoxinas

RESUMO

Os fungos toxigênicos, produtores de micotoxinas, são contaminantes de produtos alimentícios no campo e no armazenamento. As aflatoxinas B₁ (AFB₁) e B₂ (AFB₂) são micotoxinas produzidas por *Aspergillus flavus* Link, estas são substâncias altamente tóxicas, mutagênicas, teratogênicas e carcinogênicas. A *Curcuma longa* L., pertencente à família Zingiberaceae, planta nativa do sudeste da Ásia apresenta propriedades antimicrobianas, antioxidantes e antifúngicas. O objetivo deste estudo foi verificar o efeito do óleo essencial de *Curcuma longa* L. e da curcumina na produção de AFB₁ e AFB₂ por *A. flavus* “*in vitro*”. O óleo essencial utilizado foi caracterizado por cromatografia gasosa acoplada ao espectrofotômetro de massas e ressonância magnética nuclear. Os meios-testes (Yeast Extract Sucrose – YES) foram preparados em quadriplicata para conter o óleo de *Curcuma longa* L. nas concentrações de 0,01; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0% e o padrão de curcumina nas concentrações de 0,01; 0,1; 0,25 e 0,5%, posteriormente foram inoculados 10⁶ esporos de *A. flavus*. A detecção e quantificação das micotoxinas foram realizadas por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência com sistema de detecção por fluorescência. Tanto o óleo como o padrão de curcumina inibiram significativamente a produção de AFB₁ e AFB₂ por *A. flavus*. No entanto, o efeito inibitório do óleo essencial foi maior quando comparado com a curcumina, pois na concentração de 0,5% a produção de AFB₁ foi de 1,0 e 42,7 µg/mL para tratados com óleo essencial de *Curcuma longa* L. e curcumina, respectivamente. Este estudo demonstrou que o óleo essencial de *Curcuma longa* L. e a curcumina apresentaram atividades antiaflatoxigênicas.

Palavras-chave: *Aspergillus flavus* Link, *Curcuma longa* L., Curcumina, Micotoxinas, Atividade antiaflatoxigênica.

Inhibitory effect of essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin in aflatoxin production

ABSTRACT

Toxigenic fungi, mycotoxin producers, are contaminants of food products in the field and in storage. The aflatoxins B₁ (AFB₁) and B₂ (AFB₂) are mycotoxins produced by *Aspergillus flavus* Link, these substances are highly toxic, mutagenic, teratogenic and carcinogenic. The *Curcuma longa* L., belonging to the Zingiberaceae family, a native plant of Southeast Asia, has antimicrobial, antioxidant and antifungal properties. The aim of this study was to investigate the effect of essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin on the production of AFB₁ and AFB₂ by *A. flavus* “*in vitro*”. Essential oil used was characterized by gas chromatography-mass spectroscopy and nuclear magnetic resonance. The media-tests (Yeast Extract Sucrose - YES) were prepared to contain the oil of *Curcuma longa* L. at concentrations of 0.01, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0, 2.5 and 5.0% and the curcumin standard at concentrations of 0.01, 0.1; 0.25 and 0.5%, later 10⁶ spores of *A. flavus* were inoculated. The detection and quantification of mycotoxins were realized by thin layer chromatography and high performance liquid chromatography with system of fluorescence detection. Both the oil and curcumin significantly inhibited the production of AFB₁ and AFB₂ by *A. flavus*. However, the inhibitory effect of essential oil was higher where compared with the standard of curcumin. The production of AFB₁ was of 1.0 and 42.7 µg/mL for the ones treated with essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin at the concentration of 0.5%, respectively. This study demonstrated that the essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin showed antiaflatoxigenics activities.

Keywords: *Aspergillus flavus* Link, *Curcuma longa* L., Curcumin, Mycotoxins, Antiaflatoxigenic activity.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1	Estrutura química das principais aflatoxinas.....	15
Figura 2	Estrutura química dos pigmentos curcuminóides presente na <i>Curcuma longa</i> L.	19

Capítulo 2

Figura 1	Cromatograma em camada delgada dos meios testes com óleo essencial de <i>Curcuma longa</i> L. (0,01%, 0,1%, 0,5% e 1,0%) e padrão (P) de AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , fase móvel: tolueno-acetato de etila-clorofórmio-ácido fórmico (70:50:50:20, v/v/v/v).....	52
Figura 2	Cromatograma do óleo dos rizomas de <i>Curcuma longa</i> L., com os componentes ar-turmerona (36,32), α -turmerona (36,44) e β -turmerona (37,64).....	53

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1	Limites máximos admissíveis de concentração de aflatoxinas em milho, amendoim e leite no Brasil.....	16
-----------------	--	----

Capítulo 2

Tabela 1	Efeito inibitório do óleo essencial de <i>Curcuma longa</i> L. em diferentes concentrações na produção de aflatoxinas por <i>Aspergillus flavus</i> Link “ <i>in vitro</i> ”	49
Tabela 2	Efeito inibitório da curcumina em diferentes concentrações na produção de aflatoxinas por <i>Aspergillus flavus</i> Link “ <i>in vitro</i> ”	50
Tabela 3	Composição percentual dos principais compostos do óleo do rizoma da <i>Curcuma longa</i> L. analisados por CG-EM e RNM.....	51

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da publicação científica: *International Journal of Food Microbiology* (artigo). Disponível em:

http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/505514/authorinstructions

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. MICOTOXINAS.....	14
3. AFLATOXINAS.....	14
3.1. Características Gerais.....	14
3.2. Toxicocinética e toxicodinâmica das Aflatoxinas.....	16
4. AÇÃO ANTIAFLATOXIGÊNICA POR EXTRATOS DE PLANTAS.....	17
5. <i>Curcuma longa</i> L.....	17
5.1. Características gerais.....	17
5.2. Características botânicas.....	18
5.3. Propriedades e utilização.....	18
5.4. Composição química.....	19
5.5. Aspectos toxicológicos.....	20
6. JUSTIFICATIVA.....	20
7. OBJETIVOS.....	20
7.1 Objetivo geral.....	20
7.2 Objetivos específicos.....	20
8. REFERÊNCIAS	21
CAPÍTULO II.....	28
Resumo.....	30
Abstract.....	31
1. Introdução.....	32
2. Materiais e Métodos.....	33
3. Resultados e Discussão.....	37
5. Referências.....	41
3 CAPÍTULO III.....	54
CONCLUSÕES.....	54
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	54

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Os fungos toxigênicos, produtores de micotoxinas, são os maiores contaminantes de produtos alimentícios no campo e no armazenamento. Grande parte das micotoxinas conhecidas até o momento tem sido identificadas como metabólitos secundários dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Pitt e Hocking, 1997).

Espécies de *Aspergillus* são amplamente encontradas como contaminantes de grãos no período pós-colheita, por isso, são classificadas como fungos de armazenamento, sendo iniciadores da deterioração de grãos, causando descoloração, alterações nutricionais e perda da matéria seca. As aflatoxinas são produzidas por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, têm sua origem bioquímica a partir da molécula de acetil-CoA, através da via policetídica. São conhecidas por serem substâncias altamente tóxicas, mutagênicas, teratogênicas e carcinogênicas (Rustom, 1997). A contaminação de alimentos por aflatoxinas tem afetado de forma acentuada importantes culturas como o milho e o amendoim, e preocupado os órgãos de saúde pública que visam regulamentar e fiscalizar a presença destas substâncias nos alimentos (Chao et al., 2000).

Agentes químicos inibidores fúngicos são frequentemente utilizados na conservação de grãos estocados (Chao et al., 2000; Cakir et al., 2005). Entretanto, existe uma série de problemas relacionados com o desenvolvimento de resistência fúngica a esses compostos (Cakir et al., 2005), seu uso intensivo tem favorecido o surgimento de pragas secundárias sem conseguir eliminar os problemas já existentes. Na tentativa de resolver esse problema, foram utilizadas concentrações crescentes desses produtos, o que aumentou o risco de altos níveis de resíduos tóxicos, prejudiciais ao ambiente e a saúde humana e animal. Devido a todas essas desvantagens associadas ao uso desses agentes existe uma tendência mundial no sentido da redução de seu uso em grãos e gêneros alimentícios. Extratos naturais de plantas podem fornecer uma alternativa para o uso desses agentes químicos sintéticos. Vários estudos têm examinado o efeito de compostos bioativos presentes em extratos de plantas como praguicidas naturais e grande parte desses compostos tem demonstrado efeito inibitório (Chao et al., 2000). Compostos de origem vegetal surgem como importantes agentes de controle de pragas, por serem de fácil obtenção e utilização, terem baixo custo e sem os problemas apresentados pelos produtos químicos sintéticos (Martinez, 2002).

2. MICOTOXINAS

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos, ocorre em diferentes regiões do mundo e representam um risco potencial para a saúde do homem e dos animais quando presentes nos alimentos e rações (Nordin e Luchese, 1998). O termo micotoxina é derivado da palavra grega “mykes” que significa fungo e “toxicum” que significa toxina. Quando produzidos em associação com alimentos, ração animal e forragens, os metabólitos tóxicos podem ser ingeridos pelo homem e animais, provocando as micotoxicoses (Gonzalez et al., 2001).

As micotoxicoses podem ocorrer, tanto em países industrializados como em países em desenvolvimento, e elevar-se quando combinadas com as condições ambientais, sociais e econômicas (Aycicek et al., 2005). Mais de quatrocentas micotoxinas, conhecidas na atualidade, são produzidas por aproximadamente uma centena de fungos. As principais micotoxinas encontradas naturalmente em alimentos são as aflatoxinas, produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* como *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*; as ocratoxinas, produzidas pelo *Aspergillus ochraceus* e diversas espécies do gênero *Penicillium*; os tricotecenos, a zearalenona e as fumonisinas, produzidas por diversas espécies do gênero *Fusarium* (Dilkin, 2002).

Além de diversos efeitos tóxicos agudos, estas toxinas podem acarretar problemas crônicos como a imunossupressão e o câncer. Ainda que o fungo possa ser inativado ou retirado durante o processamento e não estar presente no produto manufaturado, as toxinas permanecem viáveis, pois não são facilmente degradáveis (Nunes et al., 2003).

3. AFLATOXINAS

3.1. Características gerais

As aflatoxinas (AFs) são metabólitos secundários, produzidos por algumas cepas de fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente das espécies *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, os quais se desenvolvem naturalmente em produtos alimentícios, como amendoim, milho, feijão, arroz, trigo, entre outros (Rosseto et al., 2003; Bruno, 2000). *Aspergillus flavus* Link produz somente as aflatoxinas B, enquanto as outras duas espécies produzem as aflatoxinas B e G. As principais AFs de interesse são denominadas aflatoxina B₁ (AFB₁); B₂ (AFB₂); G₁ (AFG₁) e G₂ (AFG₂). A AFB₁ é a mais tóxica do grupo, seguida pela AFG₁, AFB₂

e AFG₂ com toxicidade de 50%, 20% e 10% em relação à primeira, respectivamente (Creppy, 2002).

Dentre as micotoxinas conhecidas, as aflatoxinas são as que podem causar maiores danos aos seres humanos e animais, pela sua alta toxicidade e ampla ocorrência, possuindo propriedades carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas (Sylos et al., 1996) e imunossupressoras (Nordin e Luchese, 1998). Estes efeitos sofrem influência do estado nutricional, sexo, idade, exposição a outros agentes químicos, dose e período de exposição à toxina, espécie, frequência e composição da dieta (Amado, 2002).

O fígado é o órgão alvo para esses compostos, além de induzir o câncer as AFs podem ocasionar outros efeitos como a cirrose hepática, a diminuição da resistência imunológica favorecendo surtos de hepatites virais tipo B, estando também associada à Síndrome de Reye, febre, convulsões, vômito, coma, entre outros (AOAC, 1982).

Quimicamente, as aflatoxinas apresentam um grupo de compostos heterocíclicos altamente oxigenados; sua estrutura consiste de um núcleo cumarínico fundido com um anel bifurano e mais um anel pentanona ou 6-lactona. As aflatoxinas B e M apresentam o anel pentanona, enquanto as aflatoxinas G possuem o anel 6-lactona (Applebaum et al., 1982). A Figura 1 apresenta as estruturas químicas das principais aflatoxinas.

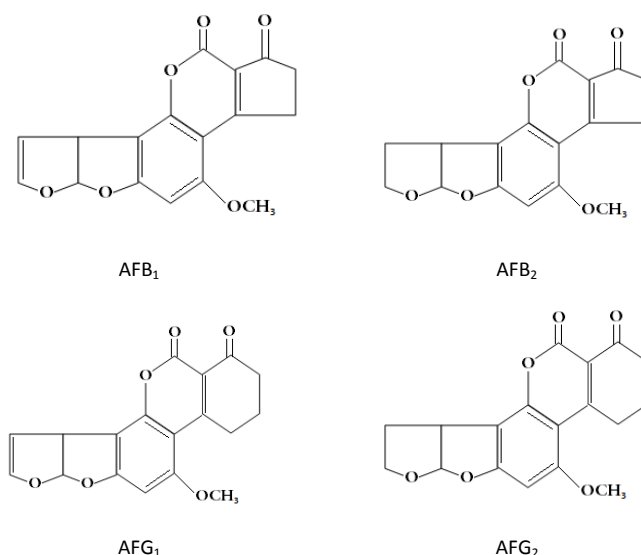


Figura 1: Estrutura química das principais aflatoxinas.

No Brasil, as AFs são as únicas micotoxinas cujos níveis máximos em alimentos estão previstos na legislação. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), RDC N. 274, de 15 de outubro de 2002, estabelece os limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim e no milho (Brasil, 2002), conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Limites máximos admissíveis de concentração de aflatoxinas em milho, amendoim e leite no Brasil.

Alimento	Aflatoxina	Limite Máximo
Milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído); Farinhas ou sêmolos de milho.	$B_1 + B_2 + G_1 + G_2$	20,0 µg/kg
Amendoim (com casca), (descascado, cru ou tostado); Pasta de amendoim (pasta de amendoim ou manteiga de amendoim).	$B_1 + B_2 + G_1 + G_2$	20,0 µg/kg
Leite fluído; Leite em pó	M_1	0,5 µg/L; 5,0 µg/kg

Fonte: BRASIL, 2002.

3.2. Toxicocinética e toxicodinâmica das Aflatoxinas

As aflatoxinas são absorvidas no trato gastrointestinal e biotransformadas primariamente no fígado, por enzimas microsossomais do sistema P-450 (Forrester et al, 1990). A biotransformação da AFB₁ tem sido estudada com maior interesse, uma vez que guarda estreita relação com seus mecanismos de ação tóxica (Biehl e Buck, 1987; Reddy et al., 2006). A AFB₁ requer ativação metabólica para manifestar seus efeitos toxigênicos (Biehl e Buck, 1987; Hsieh e Atkinson, 1991; Wogan, 1992). A forma ativada da AFB₁ é o composto identificado como 8,9-epóxido de AFB₁, ou AFB₁-epóxido originado através da epoxidação da dupla ligação do éter vinílico presente na estrutura bifuranóide da molécula de aflatoxina B₁ (Cova et al., 1990).

O composto AFB₁-epóxido, altamente eletrofílico, é capaz de reagir rapidamente, através de ligações covalentes, com sítios nucleofílicos de macromoléculas, como ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA) e proteínas (Biehl e Buck, 1987). Estas ligações determinam a formação de adutos, os quais representam a lesão bioquímica primária produzida pelas aflatoxinas. Esta ligação com o DNA modifica a sua estrutura e consequentemente sua atividade biológica originando efeitos mutagênicos e carcinogênicos (Hendrickse, 1991).

Os adutos de RNA e de proteínas determinam lesões bioquímicas, as quais devem, provavelmente, estar envolvidas com os mecanismos de toxicidade aguda da AFB₁, uma vez que conduzem à morte celular pela inativação de macromoléculas essenciais às células (Hendrickse, 1991).

Além da expoxidação, a biotransformação primária da AFB₁ também inclui a hidroxilação, para formação de outras aflatoxinas. As aflatoxinas M₁, Q₁ e B_{2a} contêm o grupo hidroxila na molécula, o que permite conjugação com ácido glicurônico ou sulfatos, tornando-se solúveis em água, permitindo sua excreção através da urina ou bile e, em seguida, nas fezes (Biehl e Buck, 1987). Isto pode constituir parte do processo de detoxificação embora, a aflatoxina M₁, apresente hepatotoxicidade (Hsieh et al., 1991).

4. AÇÃO ANTIAFLATOXIGÊNICA POR EXTRATOS DE PLANTAS

Diversos autores têm demonstrado ações antiaflatoxigênicas de extratos de plantas. Pinto et al. (2001) e Gonzalez et al. (2003) demonstraram que extratos etanólicos das folhas de *Polymnia sonchifolia* (yacon) inibiram em quase 80% a síntese de aflatoxinas B₁ e B₂ por *A. flavus*. Chalfoun et al. (2004) verificaram que a *Cinnamomum zeylanicum* (canela) em pó inibiu completamente a síntese de aflatoxinas por *A. flavus*. Helal et al. (2007) descreveram que o óleo essencial do *Cymbopogon citratus* (capim-limão) possui atividade antiaflatoxigênica em *A. flavus*.

Óleos essenciais obtidos de folhas de *Cinnamomum camphora* (cânfora) e do rizoma de *Alpinia galanga* (gengibre) adicionados ao meio de cultura, promoveram a inibição da síntese de aflatoxina por *A. flavus*, na combinação de ambos os óleos a eficácia aumentou (Srivastava et al., 2008).

5. *Curcuma longa* L.

5.1. Características gerais

Curcuma longa L. conhecida como açafrão ou cúrcuma, tem sua importância econômica devida às peculiares características de seus rizomas, podendo ser usado como uma alternativa natural para substituição de pigmentos sintéticos, principalmente no setor alimentício (Cecílio-Filho et al., 2000).

O consumo mundial de *C. longa* não é conhecido. Acredita-se que a Índia seja o maior produtor e consumidor. No Brasil, *C. longa* ainda tem pequena expressão econômica. Mara Rosa em Goiás é o município que apresenta o maior plantio comercial, com cerca de 150 hectares e produtividade média de 12 t/ha de rizomas, produção que se destina em quase sua totalidade às indústrias nacionais de corantes e alimentos (Cecílio-Filho et al., 2000).

5.2. Características botânicas

C. longa é uma planta herbácea e perene da família Zingiberaceae, tendo como origem o sul da Índia, e cultivada na China, Kuwait, Índia, Indonésia, Sri Lanka, Filipinas, Caribe, Norte da Austrália e América do Sul. No Brasil, é cultivada ou encontrada como subespontânea em vários estados (Cecílio-Filho et al., 2000). De cultivo fácil, apresenta a vantagem de não exigir tratos culturais especiais, podendo desenvolver-se em condições tropicais, temperaturas de 20 a 30°C, sob regime pluvial de 150 cm ou mais por ano ou sob irrigação, preferencialmente sob solo argiloso ou aluvial, fértil e rico em matéria orgânica (Gonvindarajan, 1980; Milán, 1992; Scartezzini e Speroni, 2000).

A planta apresenta geralmente cinco a sete folhas grandes de coloração verde, as folhas oblongo-lanceoladas e oblíquo-nervadas, emanam um odor agradável quando amassadas (Cecílio-Filho et al., 2000). A parte aérea da planta de acordo com as condições do solo e clima pode atingir 120 cm de altura. Apresentam um pseudocaule formado na base da planta pelo agrupamento das folhas (Cecílio-Filho, 1996; Péret-Almeida, 2006).

A cúrcuma é facilmente reconhecida pela inflorescência amarelada em espiga, a floração ocorre geralmente 180 dias após o plantio (Espinosa et al., 1994). Os rizomas são periformes, arredondados ou ovóides, com ramificações secundárias laterais, compridas, também tuberizadas de coloração alaranjada, crescendo abaixo do solo e que, agrupados, formam uma estrutura chamada mão (Tainter e Grenis, 1996; Scartezzini e Speroni, 2000).

5.3. Propriedades e utilização

C. longa é utilizada há mais de 6.000 anos pela medicina indiana. Habitualmente é utilizada para o tratamento de doenças de pele, alívio de distúrbios estomacais, doenças do fígado e em resfriados (Amnon e Wahl, 1991; Roth et al., 1998). Pode ainda ser utilizada como antiinflamatório, antiartrítico, regulador das funções biliar e redutor dos níveis de colesterol (Duke, 1997; Cecílio-Filho et al., 2000). Outras propriedades medicinais da cúrcuma reconhecidas pela farmacopéia asiática são: estimulante, carminativa, expectorante, anti-helmíntico, antiinflamatório e dermatológico.

Diferentes atividades biológicas da *C. longa* têm sido descritas na literatura, como a atividade antioxidante (Masuda et al., 2001; Jayaprakasha et al., 2006; Singh et al., 2010); antimutagênica (Chattophadyay et al., 2004; Shishu e kaur, 2008); antimicrobiana (Singh et

al., 2002b; Péret-Almeida et al., 2008); inseticida (Tripathi et al., 2002) e antifúngica (Apisariyakul et al, 1995; Khattak et al., 2005; Martins et al., 2009).

Saju et al., (1998) demonstraram que o óleo essencial de *C. longa* possui ação antifúngica para fungos toxigênicos, na concentração de 5% apresentava inibição total no desenvolvimento de *Aspergillus sp.* Singh et al. (2002a) verificaram que o óleo na concentração de 1000 ppm inibia completamente o crescimento micelial de *Fusarium moniliforme* e, na concentração de 2000 ppm para *Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporum*.

A curcumina, pigmento curcuminóide presente na *C. longa* é descrito por vários pesquisadores como antifúngico, antiaflatoxigênico e anticancerígeno (Soni et al., 1992; Gowda et al., 2004; Khattak et al., 2005; Martins et al., 2009; Nayak e Sashidhar, 2010).

5.4. Composição química

Fatores como tipo de solo, disponibilidade de água, adubação, época de colheita, tempo de armazenamento, dentre outros, podem influenciar a composição química dos rizomas de *C. longa* (Scartezzini e Speroni, 2000).

Govindarajan (1980) determinou que o componente em maior teor (25 a 50%) é o amido, seguido de proteínas (4 a 10%), fibras e cinzas (2 a 7%), pigmentos curcuminóides e óleo essencial. Os pigmentos curcuminóides encontrados na *C. longa* L. são: a curcumina, a desmetoxicurcumina e a bisdesmetoxicurcumina (Figura 2). As concentrações variam de 4 a 6 mg/100g, 3 a 4 mg/100g e 2 a 3 mg/100g, respectivamente (Martins e Rusig, 1992).

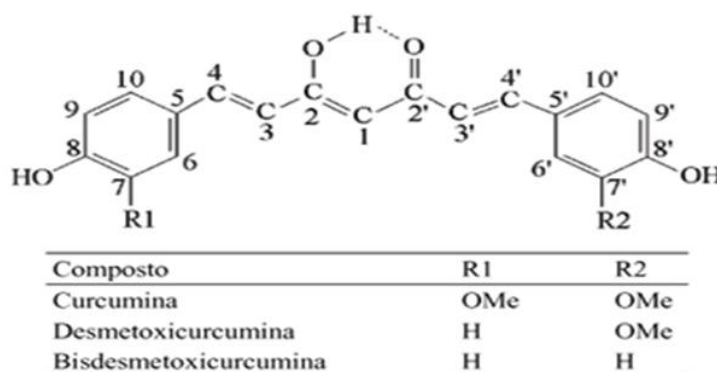


Figura 2: Estrutura química dos pigmentos curcuminóides presentes na *Curcuma longa* L. Fonte: Péret-Almeida et al. (2005)

O óleo essencial de *C. longa* L. é constituído por álcoois sesquiterpênicos e cetonas, sendo os principais componentes: turmerona (35%), ar-turmerona (12%), α e β -zingibereno

(25%), 1-8 cineol (1%), α -felandreno (1%), sabineno (0,6%) e borneol (0,5%) (Viasan et al., 1989; Ohsiro et al., 1990; Mata et al., 2004; Jayaprakasha et al., 2005).

5.5. Aspectos Toxicológicos

O Comitê de Peritos sobre Aditivos e Contaminantes de Alimentos das Nações Unidas (JECFA) em 2006 determinou que a *C. longa* L. não possui uma ingestão diária aceitável (IDA), já da curcumina foi estabelecida em 0 a 3 mg/kg.

6. JUSTIFICATIVA

A incidência de fungos e micotoxinas em produtos agrícolas têm sido alvo de preocupações constantes, necessitando de métodos de prevenção e controle eficazes, uma vez que representam risco potencial à saúde humana e animal, além do risco de grandes perdas econômicas.

A utilização de antifúngicos sintéticos no controle da contaminação de diversos tipos de cereais em fase de armazenamento pode deixar resíduos no produto final, comprometer a saúde dos consumidores e aumentar o custo de produção. Extratos naturais de plantas podem fornecer uma alternativa para o uso desses agentes químicos sintéticos.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo geral

Analisar os efeitos da curcumina e do óleo essencial de *Curcuma longa* L. na produção de aflatoxinas B₁ e B₂ por *Aspergillus flavus* Link “*in vitro*”.

7.2. Objetivos específicos

- Investigar os efeitos do óleo essencial de *Curcuma longa* L. na produção de aflatoxinas B₁ e B₂ por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Investigar os efeitos da curcumina na produção de aflatoxinas B₁ e B₂ por CCD e CLAE.

8. REFERÊNCIAS

- Amado, M. A., 2002. Métodos imunológicos na detecção e determinação de aflatoxinas em alimentos: vantagens e inconvenientes. *Millenium - Revista do Instituto Superior Politécnico de Viseu* 21.
- Amnon, H.P.T., Wahl, M.A., 1991. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Medica* 57, 1-7.
- Apisariyakul, A., Vanittanakom, N., Buddhasukh, D., 1995. Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 49, 163-169.
- Applebaum, R.S., Brackett, R.E., Wiseman, D.W., Marth, E.H., 1982. Aflatoxin: toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and milk products - a review. *Journal of Food Protection* 45. 752-777.
- Association of Official Analytical Chemists, 1982. Official methods of analysis of the Association Official Analytical Chemists, 12 nd ed. AOAC 455, 1982.
- Aycicek, H., Aksoy, A., Saygi, S., 2005. Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in Ankara, Turkey. *Food Control* 16, 263-266.
- Biehl, M.L., Buck, W.B., 1987. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. *Journal of Food Protection* 50, 1058-73.
- Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002 da ANVISA. Aprova o Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, no Amendoim, no Milho. *Diário Oficial da União – D.O.U.*, de 16 de outubro de 2002.
- Bruno, R.L.A., 2000. Qualidade fisiológica e microflora de sementes de amendoim cv. Br-1 durante o armazenamento. *Revista de Oleaginosa e Fibrosa, Campina Grande* 4, 141-152.
- Cakir, A., Kordali, S., Kilic, H., Kaya, E., 2005. Antifungal properties of essential oil and crude extract of *Hypericum linarioides* Bosse. *Biochemical systematic and Ecology* 33, 245-256.

- Cecílio-Filho, A.B., 1996. Época e densidade de plantio sobre a fenologia e rendimento da cúrcuma (*Curcuma longa*). Lavras: Universidade Federal de Lavras. 100p.
- Cecílio-Filho, A.B., SOUZA, R.J., BRAZ, L.T., TAVARES, M., 2000. Cúrcuma: planta medicinal, condimentar e de outros usos potenciais. *Ciência Rural*, Santa Maria 30, 171-175.
- Chalfoun, S.M., Pereira, M.C., Resende, M.L.V., Angélico, C.L., Silva, R.A., 2004. Effect of powdered spice treatments on micelial growth, sporulation and production of aflatoxins by toxigenic fungi. *Ciência e agrotecnologia* 28, 856-862.
- Chao, S.C., Young, D.G., Oberg, C.J., 2000. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal of Essential Oil Research* 12, 639-649.
- Chattopadhyay, I., Biswas, K., Bandyopadhyay, U., Banerjee, R.K., 2004. Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. *Current Science* 87, 44-50.
- Cova, L., Wild, C.P., Mehrotra, R., Turusov, V., Shirai T., Lambert, V., Jacquet, C., Tomatis, L., Trépo, C., Montesano, R., 1990. Contribution of aflatoxin B₁ and hepatitis B virus infection in the induction of liver tumors in ducks. *Cancer Research* 50, 2156-2163.
- Creppy, E.E., 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters* 127, 19-28.
- Dilkin, P., 2002. Micotoxicose suína: aspectos preventivos, clínicos e patológicos. *Arquivos do Instituto Biológico* 64, 187-191.
- Duke, J.A., 1997. *The green pharmacy*. Rodale, Emmaus, p.507.
- Espinosa, J., Alique, R., La Paz, J.L., 1994. *Tecnología de la conservación de productos hortícolas*. Acribia. p.432.
- Forrester, L.M., Neal, G.E., Judah, D.J., Glancey, M.J., Wolf, C.R., 1990. Evidence for involvement of multiple forms of cytochrome P-450 in aflatoxin B₁ metabolism in human liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87, 8306-8310.

- Gonçalez, E., Felicio, J.D., Pinto, M.M., Rossi, M.H., Medina, C., Fernandes, M.J.B., Simoni, I.C., 2003. Inhibition of production by *Polymnia sonchifolia* and its in vitro cytotoxicity. *Arquivos do Instituto Biológico* 70, 139-143.
- Gonçalez, E., Pinto, M.M., Felicio, J.D., 2001. Análise de micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999. *Arquivos do Instituto Biológico* 63, 15-19.
- Govindarajan, V.S., 1980. Turmeric – chemistry, technology and quality. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 12, 199-301.
- Gowda, N.K.S., Malathi, V., Suganthi, R.U., 2004. Effect of some chemical and herbal compounds on growth of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin production. *Animal Feed Science and Technology* 116, 281-291.
- Helal, G.A., Sarhan, M.M., Abu Shahla, A.N., Abou El-Khair, E.K., 2007. Effects of *Cymbopogon citratus* L. essential oil on the growth, morphogenesis and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* ML2-strain. *Journal of Basic Microbiology* 47, 5-15.
- Hendrickse, R.G., 1991. Kwashiorkor: the hypothesis that incriminates aflatoxins. *Pediatrics* 88, 376-379.
- Hsieh, D.P.H., Atkinson, D.N., 1991. Bisfuranoid mycotoxins: their genotoxicity and carcinogenicity. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 283, 525-532.
- Jayaprakasha, G.K., Jagan, L., Rao, L.J.M., Sakariah, K.S., 2005. Chemistry and biological activities of *Curcuma longa*. *Journal Food Science of Technology* 20, 1-16.
- Jayaprakasha, G.K., Rao Jaganmohan, L., Sakariah, K.K., 2006. Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Chemistry* 98, 720-724.
- JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives), 2006. Summary of evaluations performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Disponível em: < <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/search.html> >. Acesso em 20 out. 2010.

- Khattak, S., Saeed-ur-Rehman., Ullah Shah, H., Ahmad, W., Ahmad, M., 2005. Biological effects of indigenous medicinal plants *Curcuma longa* and *Alpinia galanga*. *Fitoterapia* 76, 254-257.
- Martinez, S.S., 2002. O Nim – *Azadirachta indica* Natureza, Usos Múltiplos, Produção. Instituto Agronômico do Paraná.
- Martins, C.V.B., Silva, D.L., Neres, A.T.M., Magalhães, T.F.F., Watanabel, G.A., Modolo, L.V., Sabino, A.A., Fátima, A., Resende, M.A., 2009. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 63, 337-339.
- Martins, M.C., Rusig, O., 1992. Cúrcuma – um corante natural. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos* 26, 53-65.
- Masuda, T., Maekawa, T., Hidaka, K., Bando, H., Takaeda, Y., Yamaguchi, H., 2001. Chemical studies on antioxidant mechanism of curcumin: Analysis of oxidative coupling products from curcumin and linoleate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 2539–2547.
- Mata, A.R., Nelson, D.L., Afonso, R.J.C.F., Glória, M.B.A., Junqueira, R.G., 2004. Identificação de compostos voláteis da cúrcuma empregando microextração por fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 24, 151-157.
- Milán, D.R., 1992. Cúrcuma, produção e utilização como ingrediente e aditivo na indústria de alimentos. *Revista Brasileira de Corantes Naturais* 1, 248-249.
- Nayak, S., Sashidhar, R.B., 2010. Metabolic intervention of aflatoxin B₁ toxicity by curcumin. *Journal of Ethnopharmacology* 127, 641-644.
- Nordin, N., Luchese, R. H., 1998. Detecção de aflatoxina e zearalenona em milho (*Zea mays*), destinado à alimentação animal. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia dos Alimentos* 32, 35-39.
- Nunes, I. L., Magagnin, G., Bertolin, T.E., Furlong, E.B., 2003. Arroz comercializado na região Sul do Brasil: aspectos micotoxicológicos e microscópicos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 23, 190-194.

- Ohshiro, M., Kuroyanagi, M., Ueno, A., 1990. Structures of sesquiterpenes from *Curcuma longa*. *Phytochemistry* 29, 2201-2205.
- Péret-Almeida, L., Cherubino, A.P.F., ALVES, R.J., GLÓRIA, M.B.A., 2005. Separation and determination of the physico-chemical characteristics of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Research International* 38, 1039-1044.
- Péret-Almeida, L., 2006. *Curcuma longa* L. – Separação e caracterização de pigmentos curcuminóides, avaliação da atividade antimicrobiana, cultivo in vitro para o estabelecimento de gemas, calos, órgãos (raízes) e produção de metabólitos secundários. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 136p.
- Péret-Almeida, L., Naghetini, C.C., Nunan, E.A., Junqueira, R.G., Glória, M.B.A., 2008. Atividade antimicrobiana *in vitro* do rizoma em pó, dos pigmentos curcuminóides e dos óleos essenciais da *Curcuma longa* L.. *Ciência e agrotecnologia* 32, 875-881.
- Pinto, M.M., Gonzalez, E., Rossi, M.H., Felicio, J.D., Medina, C.S., Fernandes, M.J.B., Simoni, I.C., 2001. Activity of the aqueous extract from *Polymnia sonchifolia* leaves on growth and production of aflatoxin B₁ by *Aspergillus flavus*. *Brazilian Journal of Microbiology* 32, 127-129.
- Pitt, J. I., Hocking, A.D., 1997. *Fungi and Food Spoilage*. 2nd ed. Blackie Academic & Professional. p.592.
- Reddy, L., Odhay, B., Bhoola, K., 2006. Aflatoxin B₁-induced toxicity in HepG2 cells inhibited by carotenoids: morphology, apoptosis and DNA damage. *The Journal of Biological Chemistry* 387, 87-93.
- Rosseto, C.A.V., Viegas, E.C., Lima, T.M., 2003. Contaminação fúngica do amendoim em função das doses de calcário e das épocas de amostragem. *Bragantia* 62, 37-45.
- Roth, G.N., Chandra, A., Nair, M.G., 1998. Novel bioactivities of *Curcuma longa* constituents. *Journal Natural Products* 61, 542-545.
- Rustom, I.Y.S., 1997. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry* 59, 57-61.

- Saju, K.A., Venugopal, M.N., Mathew, M.J., 1998. Antifungal and insect-repellent activities of essential oil of turmeric (*Curcuma longa* L.). *Current Science* 75, 660-662.
- Scartezzini, P., Speroni, E., 2000. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant. *Journal of Ethnopharmacology* 17, 23-43.
- Shishu., Kaur, I.P., 2008. Antimutagenicity of curcumin and related compounds against genotoxic heterocyclic amines from cooked food: The structural requirement. *Food Chemistry* 111, 573–579
- Singh G., Kapoor, I.P.S., Singh, P., Heluani, C.S., Lampasona, M.P., Catalan, C.A.N., 2010. Comparative study of chemical composition and antioxidant activity of fresh and dry rhizomes of turmeric (*Curcuma longa* Linn.). *Food and Chemical Toxicology* 48, 1026-1031.
- Singh, G., Singh, O.P., Maurya, S., 2002a. Chemical and biocidal investigations on essential oils of some Indian *Curcuma* species. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials* 45, 75-81.
- Singh, R., Chandra, R., Bose, M., Luthra, P.M., 2002b Antibacterial activity of *Curcuma longa* rhizome extract on pathogenic bacteria. *Current Science* 83, 737-740.
- Soni, K.B., Rajan, A., Kuttan, R., 1992. Reversal of aflatoxin induced liver damage by turmeric and curcumin. *Cancer Letters* 66, 115–121.
- Srivastava, B., Singh, P., Sukla, R., Dubey, N.K., 2008. A novel combination of the essential oils of *Cinnamomum camphora* and *Alpinia galangal* in checking aflatoxin B₁ production by toxigenic strain of *Aspergillus flavus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, 693-697.
- Sylos, C.M., Rodriguez-Amaya, D.B., Carvalho, P.R.N., 1996. Occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products commercialized in Campinas, Brazil. *Food Additives and Contaminants* 13, 169-172.
- Tainter, D.R., Grenis, A.T., 1996. *Especies y aromatizantes alimentarios*. Zaragoza: Ed. Acirbia, p.251.

- Tripathi, A.K., Prajapati, V., Verma, N., Bahl, J.R., Bansal, R.P., Khanuja, S.P.S., Kumar, S., 2002. Bioactivities of the Leaf Essential Oil of *Curcuma Longa* (Var. Ch-66) On Three Species of Stored-Product Beetles (Coleoptera). *Journal of Economic Entomology* 95, 183-189.
- Viasan, A.C., Menon, A.N., Rad, M.J., Narayanan, C.S., Mathew, A.G., 1989. Chemical analysis of some cultivars of *Curcuma longa* Linn. *Journal of Food Science and Technology* 26, 293-295.
- Wogan GN., 1992. Aflatoxin carcinogenesis: interspecies potency differences and relevance for human risk assessment. *Progress in Clinical Biological Research* 374: 123-37.

CAPÍTULO II

**Artigo: EFEITO INIBITÓRIO DA CURCUMINA E ÓLEO ESSENCIAL DE
Curcuma longa L. NA PRODUÇÃO DE AFLATOXINAS POR *Aspergillus flavus* Link
“*in vitro*”**

Efeito inibitório do óleo essencial de *Curcuma longa* L. e curcumina na produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* Link “in vitro”

“In vitro” inhibitory effect of essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin in aflatoxin production for *Aspergillus flavus* Link

Flavio Dias Ferreira¹, Carlos Kemmelmeier², Carla Cristina Arroteia², Christiane Luciana da Costa², Carlos Augusto Mallmann³, Vanderly Janeiro⁴, Francine Maery Dias Ferreira¹, Simone Aparecida Galerani Mossini¹, Miguel Machinski Junior¹

¹ Departamento de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil.

² Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil.

³ Laboratório de Análises Micotoxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

⁴ Departamento de Estatística da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil.

Autor para correspondência: Miguel Machinski Junior

Endereço: Universidade Estadual de Maringá

Departamento de Ciências Básicas da Saúde

Avenida: Colombo, 5790 Bloco: J01

Fax: (44) 3011-4489

Telefone: (44) 3011-4565

E-mail: mmjunior@uem.br

Resumo

Os fungos toxigênicos, produtores de micotoxinas, são contaminantes de produtos alimentícios no campo e no armazenamento. As aflatoxinas B₁ (AFB₁) e B₂ (AFB₂) são micotoxinas produzidas por *Aspergillus flavus* Link, estas são substâncias altamente tóxicas, mutagênicas, teratogênicas e carcinogênicas. A *Curcuma longa* L., pertencente à família Zingiberaceae, planta nativa do sudeste da Ásia apresenta propriedades antimicrobianas, antioxidantes e antifúngicas. O objetivo deste estudo foi verificar o efeito do óleo essencial de *Curcuma longa* L. e da curcumina na produção de AFB₁ e AFB₂ por *A. flavus* “*in vitro*”. O óleo essencial utilizado foi caracterizado por cromatografia gasosa acoplada ao espectrofotômetro de massas e ressonância magnética nuclear. Os meios-testes (Yeast Extract Sucrose – YES) foram preparados em quadriplicata para conter o óleo de *Curcuma longa* L. nas concentrações de 0,01; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0% e o padrão de curcumina nas concentrações de 0,01; 0,1; 0,25 e 0,5%, posteriormente foram inoculados 10⁶ esporos de *A. flavus*. A detecção e quantificação das micotoxinas foram realizadas por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência com sistema de detecção por fluorescência. Tanto o óleo como o padrão de curcumina inibiram significativamente a produção de AFB₁ e AFB₂ por *A. flavus*. No entanto, o efeito inibitório do óleo essencial foi maior quando comparado com a curcumina, pois na concentração de 0,5% a produção de AFB₁ foi de 1,0 e 42,7 µg/mL para tratados com óleo essencial de *Curcuma longa* L. e curcumina, respectivamente. Este estudo demonstrou que o óleo essencial de *Curcuma longa* L. e a curcumina apresentaram atividades antiaflatoxigênicas.

Palavras-chave: *Aspergillus flavus* Link, *Curcuma longa* L., Curcumina, Micotoxinas, Atividade antiaflatoxigênica.

Abstract

Toxigenic fungi, mycotoxin producers, are contaminants of food products in the field and in storage. The aflatoxins B₁ (AFB₁) and B₂ (AFB₂) are mycotoxins produced by *Aspergillus flavus* Link, these substances are highly toxic, mutagenic, teratogenic and carcinogenic. The *Curcuma longa* L., belonging to the Zingiberaceae family, a native plant of Southeast Asia, has antimicrobial, antioxidant and antifungal properties. The aim of this study was to investigate the effect of essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin on the production of AFB₁ and AFB₂ by *A. flavus* “*in vitro*”. Essential oil used was characterized by gas chromatography-mass spectroscopy and nuclear magnetic resonance. The media-tests (Yeast Extract Sucrose - YES) were prepared to contain the oil of *Curcuma longa* L. at concentrations of 0.01, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0, 2.5 and 5.0% and the curcumin standard at concentrations of 0.01, 0.1; 0.25 and 0.5%, later 10⁶ spores of *A. flavus* were inoculated. The detection and quantification of mycotoxins were realized by thin layer chromatography and high performance liquid chromatography with system of fluorescence detection. Both the oil and curcumin significantly inhibited the production of AFB₁ and AFB₂ by *A. flavus*. However, the inhibitory effect of essential oil was higher where compared with the standard of curcumin. The production of AFB₁ was of 1.0 and 42.7 µg/mL for the ones treated with essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin at the concentration of 0.5%, respectively. This study demonstrated that the essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin showed antiaflatoxigenics activities.

Keywords: *Aspergillus flavus* Link, *Curcuma longa* L. Curcumin, Mycotoxins, Antiaflatoxigenic activity.

1. Introdução

Os fungos toxigênicos, produtores de micotoxinas, são contaminantes de produtos alimentícios no campo e no armazenamento. Grande parte das micotoxinas conhecidas até o momento tem sido identificadas como metabólitos secundários dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Pitt e Hocking, 1997). As aflatoxinas (AFs) são micotoxinas produzidas por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, estas são substâncias altamente tóxicas, mutagênicas, teratogênicas e carcinogênicas (Rustom, 1997). A aflatoxina B₁ (AFB₁) é mais tóxica que as demais, provoca dano celular, liberação de radicais livres e peroxidação lipídica (Surai, 2002). No fígado, a AFB₁ sofre epoxidação da dupla ligação do éter vinílico presente na estrutura bifuranocumarina para 8,9-epóxido de AFB₁, forma bioativa da toxina (Biehl e Buck, 1987; Geyikoglu e Turkez, 2005; Lin et al., 2006; Reddy et al., 2006).

Diversos autores têm demonstrado que extratos aquosos e oleosos de diferentes plantas possuem atividade fungicida ou são capazes de inibir a síntese de micotoxinas. Além disso, tem-se procurado elucidar o efeito de substâncias bioativas isoladas sobre o crescimento, a morfogênese e o metabolismo primário e secundário de fungos (Allameh et al., 2002; Mossini et al., 2004; Razzaghi-Abyaneh et al., 2005; Arroiteia et al., 2007; Helal et al., 2007; Klich, 2007).

Curcuma longa L., pertencente à família Zingiberaceae, planta nativa do sudeste da Ásia apresenta propriedades antimicrobianas, antioxidantes e antifúngicas (Cecílio-Filho et al., 2000; Apisariyakul et al., 1995). O óleo essencial de *C. longa* é constituído por álcoois sesquiterpênicos e cetonas, sendo os principais componentes: turmerona (35%), ar-turmerona (12%), α e β -zingibereno (25%), 1-8 cineol (1%), α -felandreno (1%), sabineno (0,6%) e borneol (0,5%) (Viasan et al., 1989; Ohshiro et al., 1990; Mata et al., 2004; Jayaprakasha et al., 2005). A curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina são os principais

pigmentos curcuminóides encontrados na *C. longa* (Jayaprakasha et al., 2006). O objetivo deste estudo foi verificar o efeito do óleo essencial de *C. longa* e da curcumina na produção de AFB₁ e AFB₂ por *Aspergillus flavus* Link “*in vitro*”.

2. Material e métodos

2.1. Microrganismo

O fungo *A. flavus* Link (AF42), produtor de AFB₁ e AFB₂, foi obtido do banco de isolados do Laboratório de Química e Fisiologia de Microrganismos da Universidade Estadual de Maringá (DBQ/UEM). Para a produção de esporos, o fungo foi cultivado em meio Ágar Batata Dextrose por 7 dias, a 25°C no escuro (FANEM Modelo 347G, São Paulo, São Paulo, Brasil). Os esporos foram suspensos em solução estéril 0,01% de Tween 80 (Emfal, Betim, Brasil), segundo o método descrito por Smith e Onions (1983) e Betina (1984).

2.2. Obtenção do óleo essencial de *Curcuma longa* L.

O pó de *C. longa* foi adquirido da Cooperativa de Açafrão de Mara Rosa, Brasil, safra 2009. Para a extração do óleo essencial, 60 g de *C. longa* em pó foi adicionada a 500 mL de n-hexano. Esta mistura foi mantida à temperatura ambiente por 12 h sob agitação e filtrada (Whatman, Maidstone, Inglaterra). A obtenção do óleo essencial foi realizada em evaporador rotatório (Fisatom – Modelo 803, São Paulo, Brasil) à 60°C (Singh et al., 2002b). Este método foi utilizado, uma vez que Péret-Almeida et al. (2008) demonstrou que a extração com n-hexano apresentou melhor rendimento que a hidrodestilação. O óleo foi adicionado diretamente no meio de cultivo para obter as concentrações de 0,01, 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0%.

2.3. Análise do óleo essencial do rizoma de *Curcuma longa* L. e identificação química

2.3.1. Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas (CG/EM)

Foi utilizado um cromatógrafo à gás (GC) da Thermo Electron Corporation, modelo Focus GC, nas seguintes condições cromatográficas: coluna capilar DB-5 (30 m x 0,32 mm, 0,50 mm), temperatura da coluna de 60°C (1 min) a 180°C com aumento de temperatura de 3°C/min, temperatura do injetor a 220°C, temperatura do detector a 220°C, razão de split 1:10; velocidade do gás He de 1,0 mL/min. O volume injetado foi de 1 µL diluído em acetona (1:10). A análise por CG/EM foi realizada em um espectrômetro de massas quadrupolo (Thermo Electron Corporation, DSQ modelo II, Austin, EUA), operando a 70 eV. A identificação dos componentes químicos foi baseada na comparação de seus índices de retenção (RI) em colunas apolares e comparadas com espectros de massas de padrões adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) (Adams, 2001).

2.3.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Espectros de ^1H (300,06 MHz) e ^{13}C (75,45 MHz) foram obtidos em espectrômetro Varian Mercury-300BB (Santa Clara, EUA), com δ (ppm) e espectros comparados ao CDCl_3 (δ 7,27 por ^1H e 77,00 para ^{13}C) como padrão interno.

2.3. Padrão de curcumina

O padrão utilizado foi Curcumin from *Curcuma longa* (Turmeric) Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Este foi adicionado diretamente no meio de cultivo para obter as concentrações de 0,01; 0,1; 0,25 e 0,5%.

2.4. Padrão de aflatoxinas

Os padrões de aflatoxinas foram da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) e o preparo das soluções padrão estoque e de uso foi realizado segundo o Manual de Métodos Oficiais de Análises da AOAC (1995). As concentrações das soluções estoques individuais para cada toxina foi determinada por espectrofotometria no ultravioleta Shimadzu UV-1601PC (Shimadzu, Tóquio, Japão) em 350 nm. A partir destas soluções foi preparada a solução de trabalho com uma mistura das toxinas: 5 µg/mL para AFB₁ e AFG₁ e 1,5 µg/mL para AFB₂ e AFG₂ em benzeno-acetonitrila (98:2).

2.4. Reagentes

Os reagentes utilizados para o cultivo fúngico e a cromatografia em camada delgada foram de grau analítico (p.a.). Para cromatografia líquida de alta eficiência os reagentes usados foram de grau cromatográfico. Os reagentes foram metanol (Honeywell Burdick & Jackson, Muskegon, EUA), acetonitrila (Fisher scientific, Fair Lawn, EUA), ácido acético glacial (Mallinckrodt Baker, Xalostoc, México), tolueno (CAQ, Diadema, Brasil), n-hexano (FMaia, Cotia, Brasil), benzeno (Merck, Darmstadt, Alemanha), clorofórmio (Labsynth, Diadema, Brasil), sulfato de sódio anidro (Labsynth, Diadema, Brasil), acetato de etila (Labsynth, Diadema, Brasil), ácido trifluoracético (CAQ, Diadema, Brasil).

2.5. Experimento

O meio líquido Yeast Extract Sucrose (YES) foi utilizado no estudo para produção de aflatoxinas por *A. flavus* Link (Smith e Onions, 1983) na presença (controle) e ausência (testes) do óleo de *Curcuma longa* L. e do padrão de curcumina. Os meios-testes foram preparados em quadruplicata para conter o óleo nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0% e o padrão de curcumina nas concentrações de 0,01; 0,1; 0,25 e 0,5%. Os

meios foram esterilizados em autoclave Vertical FABBE – Modelo 103 (Piracicaba, Brasil), posteriormente foram inoculados 10^6 esporos de *A. flavus* Link (Taniwaki et al., 1993) e incubados durante 7 dias a 27°C no escuro (FANEM – Modelo 347 G, São Paulo, Brasil), segundo Farag et al. (1989).

2.5. Extração das aflatoxinas

Após o período de incubação, os meios de cultivo (n=52) foram filtrados e uma alíquota de 20 mL foi particionada duas vezes com 30 mL de clorofórmio. Ao extrato foi adicionado 5 g de sulfato de sódio anidro, seguido de filtração e concentração em rotaevaporador (Fisatom – Modelo 803, São Paulo, Brasil), segundo Taniwaki et al. (1993). O resíduo foi ressuspensionado em 2000 µL de benzeno-acetonitrila (98:2, v/v) e separados em duas alíquotas e, utilizadas para os experimentos de detecção e quantificação das micotoxinas por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência com sistema de detecção por fluorescência.

2.6. Detecção e quantificação das aflatoxinas

2.6.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Foram aplicados 10 µL do extrato dos meios-testes e controle, e 1, 2, 5 e 10 µL da solução trabalho de aflatoxinas nas placas de cromatografia de Silica gel 60 (Merck Co. Whitehouse Station, EUA). As placas foram eluídas em solução de tolueno-acetato de etila-clorofórmio-ácido fórmico (70:50:50:20, v/v/v/v). A leitura foi realizada em luz ultravioleta de ondas longas (365 nm) por comparação visual dos extratos-testes com os extratos-controles contra o padrão da aflatoxinas.

2.6.2. Cromatografia líquida de alta eficiência com sistema de detecção por fluorescência (CLAE-DF)

A detecção e quantificação das aflatoxinas por CLAE foi realizada no Laboratório de Análises Micotoxicológicas – LAMIC da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. O método automatizado realizou a purificação do resíduo em coluna de extração de fase sólida C18. O extrato foi evaporado até a obtenção do resíduo, este foi ressuspensionado com 200 µL de benzeno. A derivação química das aflatoxinas foi realizada ao adicionar 700 µL da solução de ácido trifluoracético:ácido acético glacial:água (2:1:7, v/v/v) e posteriormente submetido ao aquecimento à 65°C por 10 minutos. O extrato foi submetido à análise no cromatógrafo líquido de alta eficiência HP 1200 da Agilent (Santa Clara, EUA) nas seguintes condições: injeção de 50 µL; fase móvel: ácido acético 0,2%:acetonitrila:metanol (78:12:10, v/v/v); coluna: Chromolith RP-18e 100 x 4,6 mm (Darmstadt, Alemanha) na temperatura de 50°C; comprimento de excitação e emissão de 365 e 450 nm, respectivamente. O método apresentou limite de quantificação de 1 µg/Kg e coeficiente médio de recuperação de 85,5%.

2.7. Análise estatística

Para comparação dos tratamentos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrica de um fator), seguido de comparações múltiplas de pares de tratamentos com 5% de significância (Conover, 1999). Os resultados foram obtidos por meio de funções implementadas no programa estatístico R (R Development Core Team, 2006).

3. Resultados e Discussão

Os resultados por CLAE-DF demonstraram que o óleo essencial de *C. longa* e a curcumina suprimiram a produção de AFB₁ e AFB₂ (Tabelas 1 e 2). O efeito inibitório do óleo e da

curcumina na produção de aflatoxinas foi proporcional ao aumento de suas respectivas concentrações ($p=1,455 \times 10^{-6}$ para AFB₁ e $2,007 \times 10^{-6}$ para AFB₂). O potencial inibitório do óleo avaliado nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0% não demonstraram diferença significativa. Portanto, a partir de 0,5% do óleo essencial de *C. longa* houve uma inibição na produção de aflatoxinas por *A. flavus* de 99,90 e 99,61% para AFB₁ e AFB₂, respectivamente (Tabela 1, Figura 1). Resultados semelhantes foram obtidos por Gowda et al. (2004) e Reddy et al. (2009), na concentração de 0,5% (5 g/kg) houve a inibição da produção de AFB₁ em 77% e 72,2%, respectivamente. No entanto, os autores utilizaram a *C. longa* em pó e não o óleo essencial.

A literatura científica tem demonstrado as diferentes atividades biológicas do óleo essencial de *C. longa*, como a atividade antioxidante (Masuda et al., 2001; Jayaprakasha et al., 2006; Singh et al., 2010); antimutagênica (Chattopadhyay et al., 2004; Shishu e kaur, 2008); antimicrobiana (Singh et al., 2002b; Péret-Almeida et al., 2008); inseticida (Tripathi et al., 2002) e antifúngica (Apisariyakul et al., 1995; Khattak et al., 2005; Martins et al., 2009). Alguns autores demonstraram que o óleo essencial de *C. longa* possui ação antifúngica para fungos toxigênicos. Saju et al. (1998) demonstraram que a concentração de 5% apresentava inibição total no desenvolvimento de *Aspergillus sp.* Singh et al. (2002a) verificaram que o óleo na concentração de 1000 ppm (0,1%) inibia completamente o crescimento micelial de *Fusarium moniliforme* e, na concentração de 2000 ppm (0,2%) para *Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporum*.

De acordo com a Tabela 2, a curcumina inibiu a produção de AFs a partir da concentração de 0,1%. Nesta concentração o potencial de inibição foi de 49,2 e 58,5% para AFB₁ e AFB₂, respectivamente. Soni et al. (1992) relataram uma redução de 90% na produção de aflatoxinas

utilizando uma concentração de 5-10 mg/mL (0,05-0,1%) de rizoma da cúrcuma, efeito atribuído pelos autores à curcumina.

Na concentração de 0,5% de óleo essencial de *C. longa* e curcumina, a concentração média foi de 1,0 e 42,7 µg/mL para a produção de AFB₁ por *A. flavus*, respectivamente (Tabela 1 e 2). A análise estatística pelo método de comparações múltiplas de pares de tratamentos demonstrou que o óleo essencial apresentou um potencial antiaflatoxigênico maior que a curcumina para ambas toxinas (AFB₁= 45,75 e 35,75 para óleo essencial de *C. longa* e curcumina, respectivamente. AFB₂= 45,5 para óleo essencial de *C. longa* e 34,5 para curcumina). Portanto, a ação antiaflatoxigênica não depende apenas da curcumina, uma vez que o óleo não contém pigmentos curcuminóides como demonstrado neste (Figura 2) e demais estudos (Viasan et al., 1989; Ohshiro et al., 1990; Sharma et al., 1997; Singh et al., 2002a; Mata et al., 2004; Jayapraskasha et al., 2005; Péret-Almeida et al., 2008). A Tabela 3 demonstra os componentes majoritários obtidos do óleo analisado, que foram ar-turmerona (36%), α -turmerona (25,5%) e β -turmerona (24,7%), resultados semelhantes aos estudos de Sharma et al. (1997) e Singh et al. (2002a).

Alguns estudos concluíram que os óleos essenciais têm uma maior atividade antimicrobiana do que os principais componentes misturados (Gill et al., 2002; Mourey e Canillac, 2002), sugerindo que os componentes secundários são essenciais e possuem um efeito sinérgico ou de potenciação. Estudos com os componentes majoritários são necessários para avaliar se a ação antiaflatoxigênica decorre de um ou da mistura de compostos químicos presentes no óleo de *C. longa*.

Os componentes do óleo essencial de *C. longa* e curcumina possuem ação antioxidante, conforme demonstrado por Lachance e Guhr (1997), Masuda et al. (2001), Miquel et al. (2002), Zaeoung et al. (2005) e Singh et al. (2010). Esta ação é atribuída principalmente aos

componentes fenólicos, sendo os pigmentos curcuminóides e o óleo essencial considerados os responsáveis por esta atividade (Lachance e Guhr, 1997). Segundo Zjalic et al. (2006) a formação de metabólitos secundários está relacionada com estresse oxidativo, portanto compostos com ação antioxidante podem diminuir a produção destas toxinas. No estudo de Jayashree e Subranyam (1999), o eugenol inibiu a produção de aflatoxinas, sem qualquer efeito significativo sobre crescimento do microrganismo até a concentração de 0,75 mmol/L. Este estudo relacionou a capacidade do eugenol em inibir a peroxidação lipídica envolvida na biossíntese de aflatoxinas, sem quaisquer restrições significativas no crescimento ou eventos do metabolismo primário. Kim et al. (2008) demonstraram que compostos fenólicos inibiram as enzimas envolvidas na oxidação de moléculas endógenas, que por sua vez diminuíram a resposta oxidativa inibindo a produção de aflatoxinas.

As micotoxinas apresentam um risco à saúde humana e animal, além de representar perdas econômicas quando presente em produtos agrícolas e alimentos. Aditivos químicos sintéticos com ação fungistática ou fungicida são frequentemente utilizados para a prevenção e o controle de fungos e micotoxinas (Chao et al., 2000; Cakir et al., 2005). Entretanto, existe uma série de problemas relacionados com o desenvolvimento de resistência fúngica a esses compostos (Cakir et al., 2005). Vários estudos têm examinado o efeito de compostos bioativos presentes em extratos de plantas para serem utilizados como praguicidas naturais (Chao et al., 2000; Silva et al., 2002; Sánchez et al., 2005). O presente estudo demonstrou que o óleo essencial de *C. longa* e a curcumina apresentaram potencial de uso como praguicida natural. Portanto, se faz necessário futuros estudos com a utilização destes no controle de *A. flavus* em culturas agrícolas e alimentos.

4. Referências

- Adams R.P., 2001. Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectrometry, third ed. Allured Publishing Cooperation, Illinois.
- Allameh, A., Razzaghi Abyane, M., Shams, M., Rezaee, M.B., Jaimand, K., 2002. Effects of neem leaf extract on production of aflatoxins and activities of fatty acid synthetase, isocitrate dehydrogenase and glutathione S-transferase in *Aspergillus parasiticus*. Mycopatologia 154, 79-84.
- Apisariyakul, A., Vanittanakom, N., Buddhasukh, D., 1995. Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). Journal of Ethnopharmacology 49, 163-169.
- Arrotéia, C.C., Kimmelmeier, C., Machinski Junior, M., 2007. Effect aqueous and oily extracts of Neem [*Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae)] on patulin production in apples contaminated with *Penicillium expansum*. Ciência Rural 37, 1518-1523.
- Association of Official Agricultural Chemists International, 1995. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 16th ed. The Association of Official Analytical Chemists, Arlington.
- Betina, V., 1984. Mycotoxins: Production, Isolation, Separation and Purification, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
- Biehl, M.L., Buck, W.B., (1987). Chemical contaminants: their metabolism and their residues. Journal of Food Protection 50, 1058-1073.

- Cakir, A., Kordali, S., Kilic, H., Kaya, E., 2005. Antifungal properties of essential oil and crude extract of *Hypericum linarioides* Bosse. *Biochemical systematics and Ecology* 33, 245-256.
- Chattopadhyay, I., Biswas, K., Bandyopadhyay, U., Banerjee, R.K., 2004. Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. *Current Science* 87, 44-50.
- Cecílio-Filho, A.B., Souza, R.J., Braz, L.T., Tavares, M., 2000. Cúrcuma: planta medicinal, condimentar e de outros usos potenciais. *Ciência Rural*, Santa Maria 30, 171-175.
- Chao, S.C., Young, D.G., Oberg, C.J., 2000. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal of Essential Oil Research* 12, 639-649.
- Conover W.J., 1999. *Practical Nonparametric Statistics*, third ed. Wiley, Hoboken.
- Farag, R.S., Daw, Z.Y., Abo-Raya, S.H., 1989. Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. *Journal of Food Science* 54, 74-75.
- Geyikoglu, F., Turkez, H., 2005. Protective Effect of Sodium Selenite on Genotoxicity to Human Whole Blood Cultures Induced by Aflatoxin B₁, *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48, 905-910.
- Gill, A.O., Delaquis, P., Russo, P., Holley, R.A., 2002. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology* 73, 83-92.

- Gowda, N.K.S., Malathi, V., Suganthi, R.U., 2004. Effect of some chemical and herbal compounds on growth of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin production. *Animal Feed Science and Technology* 116, 281-291.
- Helal, G.A., Sarhan, M.M., Abu Shahla, A.N., Abou El-Khair, E.K., 2007. Effects of *Cymbopogon citratus* L. essential oil on the growth, morphogenesis and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* ML2-strain. *Journal of Basic Microbiology* 47, 5-15.
- Jayaprakasha, G.K., Jagan, L., Rao, L.J.M., Sakariah, K.S., 2005. Chemistry and biological activities of *Curcuma longa*. *Journal Food Science of Technology* 20, 1-16.
- Jayaprakasha, G.K., Rao Jaganmohan, L., Sakariah, K.K., 2006. Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Chemistry* 98, 720-724.
- Jayashree, T., Subramanyam, C., 1999. Antiaflatoxigenic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. *Letters in Applied Microbiology* 28, 179–183.
- Khattak, S., Saeed-ur-Rehman., Ullah Shah, H., Ahmad, W., Ahmad, M., 2005. Biological effects of indigenous medicinal plants *Curcuma longa* and *Alpinia galanga*. *Fitoterapia* 76, 254-257.
- Klich, M.A., 2007. Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycoscience* 48, 71-80.
- Kim, J.H., Yu, J., Mahoney, N., Chan, K.L., Molyneux, R.J., Varga, J., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Nierman, W.C., Campbell, B.C., 2008. Elucidation of the functional genomics of antioxidant-based inhibition of aflatoxin biosynthesis. *International Journal of Food Microbiology* 122, 49–60.

- Lachance, P.A., Guhr, G., 1997. Role of phytochemicals in chronic disease prevention. In: LACHANCE, P.A. Nutraceutical, designer foods III: garlic, soy and licorice. Food & Nutrition Trumbull 323-328.
- Lin W.C., Liao Y.C., Liao M.C., Lii, C.K., Sheen L.Y., 2006. Inhibitory effect of CDA-II, a urinary preparation, on aflatoxin B(1)-induced oxidative stress and DNA damage in primary cultured rat hepatocytes, Food and Chemical Toxicology 44, 546-551.
- Martins, C.V.B., Silva, D.L., Neres, A.T.M., Magalhães, T.F.F., Watanabel, G.A., Modolo, L.V., Sabino, A.A., Fátima, A., Resende, M.A., 2009. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 63, 337-339.
- Martins, M.C., Rusig, O., 1992. Cúrcuma – um corante natural. Boletim da Sociedade Brasileira de
- Masuda, T., Maekawa, T., Hidaka, K., Bando, H., Takaeda, Y., Yamaguchi, H., 2001. Chemical studies on antioxidant mechanism of curcumin: Analysis of oxidative coupling products from curcumin and linoleate. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49, 2539–2547.
- Mata, A.R., Nelson, D.L., Afonso, R.J.C.F., Glória, M.B.A., Junqueira, R.G., 2004. Identificação de compostos voláteis da cúrcuma empregando microextração por fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Ciência e Tecnologia de Alimentos 24, 151-157.
- Miquel, J., Bernd, A., Sempere, J.M., Diaz-Alperi, R.A., 2002. The curcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects future clinical use: a review. Archives of Gerontology and Geriatrics 34, 37–46.

- Mossini, S.A.G., Oliveira, K.P., Kemmelmeier, C., 2004. Inhibition of patulin production by *Penicillium expansum* cultured with neem (*Azadirachta indica*) leaf extracts. *Journal of Basic Microbiology* 44, 106-113.
- Mourey, A., Canillac, N., 2002. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control* 13, 289–292
- Ohshiro, M., Kuroyanagi, M., Ueno, A., 1990. Structures of sesquiterpenes from *Curcuma longa*. *Phytochemistry* 29, 2201-2205.
- Péret-Almeida, L., Naghetini, C.C., Nunan, E.A., Junqueira, R.G., Glória, M.B.A., 2008. Atividade antimicrobiana *in vitro* do rizoma em pó, dos pigmentos curcuminóides e dos óleos essenciais da *Curcuma longa* L.. *Ciência e agrotecnologia* 32, 875-881.
- Pitt, J. I., Hocking, A. D., 1997. *Fungi and Food Spoilage*, 2nd ed. Blackie Academic & Professional, London.
- R Development Core Team. R., 2006. *A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <<http://www.R-project.org>> Acesso em 01 jul. 2010.
- Razzaghi-Abyaneh, M., Allameh, A., Tiraihi, T., Shams-Ghahfarokhi, M., Ghorbanian, M., 2005. Morphological alterations in toxigenic *Aspergillus parasiticus* exposed to neem (*Azadirachta indica*) leaf and seed aqueous extracts. *Mycopatologia* 159, 565-570.
- Reddy, K.R.N.; Reddy, C.S.; Muralidharan, K., 2009. Potential of botanicals and biocontrol agents on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* infecting rice grains. *Food Control* 20, 173–178.

- Reddy, L., Odhay, B., Bhoola, K., 2006. Aflatoxin B₁-induced toxicity in HepG2 cells inhibited by carotenoids: morphology, apoptosis and DNA damage, *The Journal of Biological Chemistry* 387, 87-93.
- Rustom, I.Y.S., 1997. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation, and inactivation by physical methods. *Food Chemistry* 59, 57-67.
- Saju, K.A., Venugopal, M.N., Mathew, M.J., 1998. Antifungal and insect-repellent activities of essential oil of turmeric (*Curcuma Longa* L.). *Current Science* 75, 660-662.
- Sánchez, E., Heredia, N., Garcia, S., 2005. Inhibition of growth and mycotoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by extracts of *Agave* species. *International Journal of Food Microbiology* 98, 271-279.
- Sharma, R.K., Misra, B.P., Sarma, T.C., Bordoloi, A.K., Pathak, M.G., Leclercq, P.A., 1997. Essential oils of *Curcuma longa* L. from Bhutan. *Journal Essential Oil Research* 9, 589-592.
- Shishu., Kaur, I.P., 2008. Antimutagenicity of curcumin and related compounds against genotoxic heterocyclic amines from cooked food: The structural requirement. *Food Chemistry* 111, 573–579
- Silva, C.A., Maricato, J.T., Pinto, M.M., Gonçalves, E., Felicio, J.D., Rossi, M.H., 2002. Avaliação de extratos etanólicos de *Plantago major* na produção de aflatoxina B₁, B₂ e crescimento de *Aspergillus flavus*. *Arquivos do Instituto Biológico* 69, 133-135.
- Singh G., Kapoor, I.P.S., Singh, P., Heluani, C.S., Lampasona, M.P., Catalan, C.A.N., 2010. Comparative study of chemical composition and antioxidant activity of fresh and

dry rhizomes of turmeric (*Curcuma longa* Linn.). Food and Chemical Toxicology 48, 1026-1031.

Singh, G., Singh, O.P., Maurya, S., 2002a. Chemical and biocidal investigations on essential oils of some Indian *Curcuma* species. Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials 45, 75-81.

Singh, R., Chandra, R., Bose, M., Luthra, P.M., 2002b Antibacterial activity of *Curcuma longa* rhizome extract on pathogenic bacteria. Current Science 83, 737-740.

Smith, D., Onions, A.G.H., 1983. The preservation and maintenance of living fungi. Commonwealth Mycological Institute, Page Bros Ltd, Great Britain.

Soni, K.B., Rajan, A., Kuttan, R., 1992. Reversal of aflatoxin induced liver damage by turmeric and curcumin. Cancer Letters 66, 115–121.

Surai, P. F., 2002. Natural Antioxidants in Avian Nutrition and Reproduction, 1st ed. Nottingham University Press, Nottingham.

Taniwaki, M.H., Fonseca, H., Pizzirani-Kleiner, A.A., 1993. Variabilidade de produção de aflatoxinas por linhagens de *Aspergillus flavus* em diferentes tempos de manutenção. Scientia Agricola 50, 140-150.

Tripathi, A.K., Prajapati, V., Verma, N., Bahl, J.R., Bansal, R.P., Khanuja, S.P.S., Kumar, S., 2002. Bioactivities of the Leaf Essential Oil of *Curcuma Longa* (Var. Ch-66) On Three Species of Stored-Product Beetles (Coleoptera). Journal of Economic Entomology 95, 183-189.

Viasan, A.C., Menon, A.N., Rad, M.J., Narayanan, C.S., Mathew, A.G., 1989. Chemical analysis of some cultivars of *Curcuma longa* Linn. Journal of Food Science and Technology 26, 293-295.

Zjalic, S., Reverberi, M., Ricelli, A., Granito, V.M., Fanelli, C., Fabbri, A.A., 2006. Trametes versicolor: A possible tool for aflatoxins control. International Journal of Food Microbiology 107, 243-246.

Zaeoung, S., Anuchit, P., Niwat, K., 2005. Cytotoxic and free radical scavenging activities of Zingiberaceous rhizomes. Songklanakarin Journal of Science Technology 27, 799–812.

Tabela 1: Efeito inibitório do óleo essencial de *Curcuma longa* L. em diferentes concentrações na produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* Link “*in vitro*”, de acordo com o teste de comparações múltiplas não paramétricas para pares de tratamentos com 5% de significância.

Óleo essencial (%)	Aflatoxina B ₁		Aflatoxina B ₂	
	Inibição (%)	Concentração média (µg/mL)	Inibição (%)	Concentração média (µg/mL)
0 (Controle)	-	1075,2	-	256,5
0,01	36,4	684,2	58,2	107,2 ^a
0,1	53,8	496,4 ^a	78,3	55,6 ^a
0,2	66,0	365,8 ^a	87,0	33,4 ^a
0,3	80,3	212,3 ^a	89,3	27,4 ^a
0,4	84,6	165,5 ^a	91,5	21,8 ^a
0,5	99,9	1,0 ^{ab}	99,6	1,0 ^{ab}
1,0	99,9	1,2 ^{ab}	99,6	1,0 ^{ab}
2,5	99,9	1,6 ^{ab}	99,6	1,0 ^{ab}
5,0	99,7	3,1 ^{ab}	99,6	1,0 ^{ab}

^a estatisticamente diferente do controle.

^b semelhantes entre si.

Tabela 2: Efeito inibitório da curcumina em diferentes concentrações na produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* Link “*in vitro*”, de acordo com o teste de comparações múltiplas não paramétricas para pares de tratamentos com 5% de significância.

Curcumina (%)	Aflatoxina B ₁		Aflatoxina B ₂	
	Inibição (%)	Concentração média (µg/mL)	Inibição (%)	Concentração média (µg/mL)
0 (Controle)	-	1075,15	-	256,5
0,01	35,0	699,0	57,3	109,4 ^a
0,10	49,2	546,4 ^a	58,5	106,6 ^a
0,25	83,3	179,4 ^{ab}	94,8	13,3 ^{ab}
0,50	96,0	42,7 ^{ab}	98,6	3,6 ^{ab}

^a estatisticamente diferente do controle.

^b semelhante entre si, de acordo com o teste.

Tabela 3: Composição percentual dos principais compostos do óleo do rizoma da *Curcuma longa* L. analisados por CG-EM e RNM.

Tempo de retenção (min)	Compostos	Percentual (%)
36,32	Ar-Turmerona	36,0
36,44	α- Turmerona	25,5
37,64	β- Turmerona	24,7

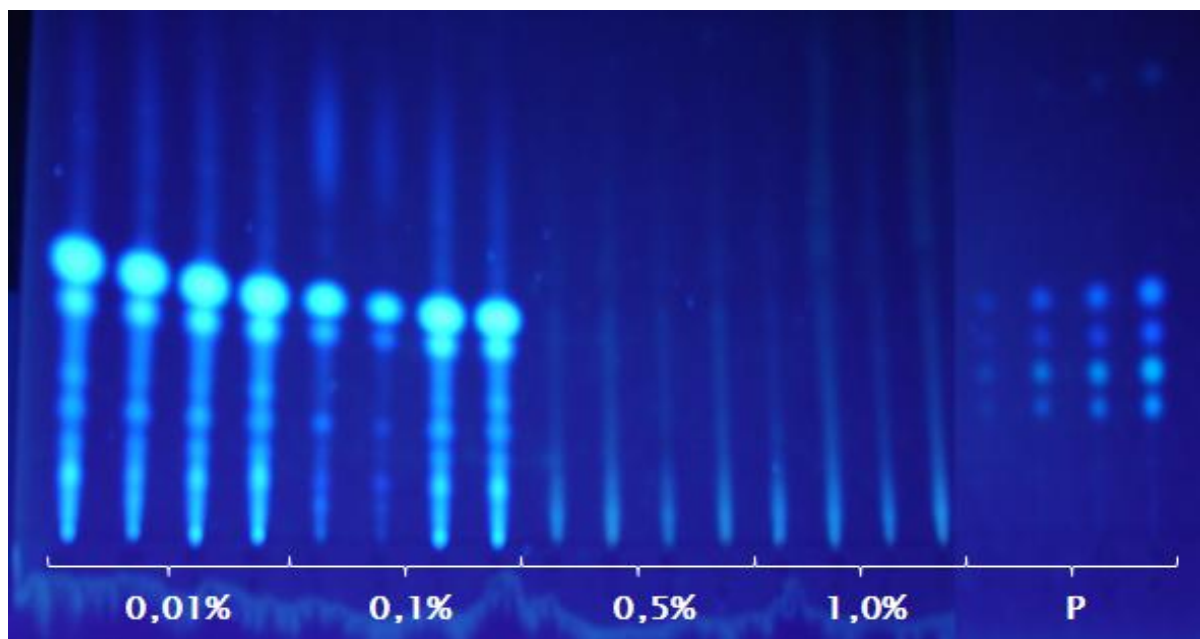


Figura 1: Cromatograma em camada delgada dos meios testes com óleo essencial de *Curcuma longa* L. (0,01%, 0,1%, 0,5% e 1,0%) e padrão (P) de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, fase móvel: tolueno-acetato de etila-clorofórmio-ácido fórmico (70:50:50:20, v/v/v/v).

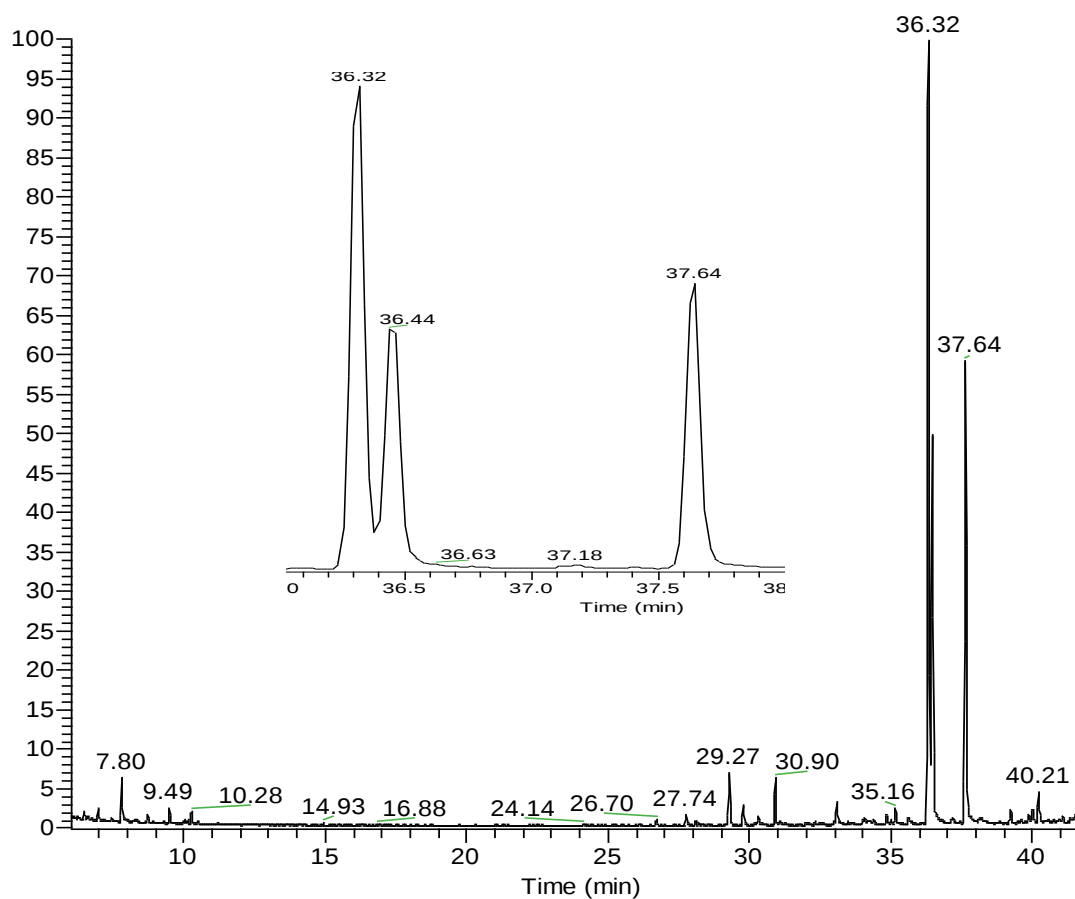


Figura 2: Cromatograma do óleo dos rizomas de *Curcuma longa* L., com os componentes ar-turmerona (36,32), α -turmerona (36,44) e β -turmerona (37,64).

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos do presente estudo demonstraram que:

- 1) O óleo essencial de *Curcuma longa* L. foi eficiente na inibição da produção de AFB₁ e AFB₂.
- 2) A curcumina apresentou efeito inibitório na produção de AFB₁ e AFB₂.
- 3) A ação antiaflatoxigênica foi superior no óleo essencial de *Curcuma longa* L. quando comparado com a curcumina.

PERSPECTIVAS FUTURAS

O desenvolvimento deste estudo e aos promissores resultados apresentados e discutidos permitiram destacar algumas perspectivas:

- 1) Realizar um estudo semelhante ao apresentado com os componentes do óleo essencial de *Curcuma longa* L.
- 2) Realizar um estudo com tratamentos de óleo essencial de *Curcuma longa* L. em culturas agrícolas para avaliar o potencial fungicida e antiaflatoxigênico.