

CRISTINA DA CUNHA NAGHETINI

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DA CÚRCUMA**

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2006**

CRISTINA DA CUNHA NAGHETINI

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DA CÚRCUMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof. Maria Beatriz Abreu Glória
Co-orientadora: Prof. Elzília Aguiar Nunan

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2006**

Dedico a meus pais, Odair Nilo e Augusta,
e aos meus irmãos, Mauro e Marcos.
Pelo amor, carinho e incentivo... sempre.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe minha grande companheira, pela compreensão, amor incondicional e exemplo de coragem e perseverança, ao meu pai o meu amor profundo, a minha saudade e minha admiração pelo homem corajoso. Meus irmãos Mauro e Marcos por todo amor. Aos meus sobrinhos, Camila, Ana Luisa e Franco que são um grande presente na minha vida e as minhas cunhadas pelo carinho.

A Deus, meu eterno obrigado.

À professora doutora Maria Beatriz Abreu Glória, pela oportunidade, orientação, amizade e carinho. Grande profissional e um exemplo de dedicação. Muito obrigada.

À professora doutora Elzília Aguiar Nunan pela sua generosidade, pelos seus ensinamentos e grande carinho.

Ao professor doutor Luiz Henrique Rosa do Departamento de Microbiologia da UFMG pela gentileza e colaboração na disponibilização das cepas de microrganismos.

Ao professor Luiz Cláudio Barbosa do Departamento de Química da UFV pela análise dos voláteis da cúrcuma.

Ao Sr. Domingos Firace da Agroindustrial Ouro Vermelho, que gentilmente doou a cúrcuma utilizada neste trabalho.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, pelos ensinamentos.

A CAPES pela bolsa de estudos que tornou o sonho possível.

A FAPEMIG pelo financiamento do projeto.

A todos os funcionários da Faculdade de Farmácia da UFMG pela simpatia e gentileza.

Ao Joel Fainblat, por estar sempre presente, mesmo nos momentos mais difíceis.
Obrigado pelo apoio, carinho, incentivo e pelos momentos hilários proporcionados.

A Lúcia Péret de Almeida o meu muito obrigado.

A minha grande companheira, Ana Amélia Paolucci Almeida, pelo carinho e amizade o meu muito obrigado por tudo. Sem a sua contribuição e grande afeto este trabalho não seria possível.

À Giuliana Elisa de Oliveira, grande amiga de todas as horas, meu grande carinho e minha amizade sempre...

As grandes amigas e companheiras de laboratório: Lúcia Péret de Almeida, Silvia Mendonça Vieira, Renata Adriana Labanca, Tânia Maria Leite Silveira, Michele Cristina Vilaça, Flávia Vitorino Freitas, Cyntia Karine Barreto Batista, Fernanda Caroline Goes, Tarliane Maria da Silva, Flávia Beatriz Custódio, Tássia Souza, Ana Paula Souza Moreira, Suzane Marques e Beatriz Depes Tallon Netto, muito obrigado sempre. Sem vocês e sem o incentivo de todas, com certeza a caminhada teria sido muito mais árdua. Muito obrigado ao Bruno Martins Dala Paula e ao Fernando Henrique Andrade Nogueira.

A toda a turma do mestrado em Ciência de Alimentos pelo excelente convívio com votos de sucesso a todos.

“Na vida, não vale tanto o que temos nem tanto importa, o que somos. Vale o que realizamos com aquilo que construímos e, acima de tudo, importa o que fazemos de nós”.

(Francisco Cândido Xavier)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
INTRODUÇÃO.....	14
REVISÃO DE LITERATURA.....	16
1 CÚRCUMA.....	16
1.1 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS.....	16
1.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	17
1.2.1 PIGMENTOS CURCUMINÓIDES.....	18
1.2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	19
1.3 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS.....	21
1.4 PROCESSAMENTO.....	22
1.5 USO EM ALIMENTOS.....	24
1.6 PROPRIEDADES FUNCIONAIS.....	25
1.6.1 PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS.....	26
2 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA..	28
3 FUNGOS FILAMENTOSOS.....	31
3.1 INFORMAÇÕES SOBRE ALGUNS FUNGOS FILAMENTOSOS...	31
MATERIAL E MÉTODOS.....	32
1 MATERIAL.....	32
2 MÉTODOS.....	33
2.1 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	33
2.2 DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	34
2.2.1 RENDIMENTO.....	34
2.2.2 DETERMINAÇÃO DO PESO ESPECÍFICO.....	34
2.2.3 ÍNDICE DE REFRAÇÃO.....	34
2.2.4 VALOR ÉSTER.....	35
2.2.5 PIGMENTOS CURCUMINÓIDES.....	35
2.2.6 PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	36
2.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DA CÚRCUMA.....	37
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
1 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	40
2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	41
2.1 PESO ESPECÍFICO.....	41
2.2 ÍNDICE DE REFRAÇÃO.....	42
2.3 VALOR ÉSTER.....	42
2.4 TEORES DE PIGMENTOS CURCUMINÓIDES.....	43
2.5 PERFIL DOS ÓLEOS ESSENCIAIS POR CG-IC E CG-EM.....	44

3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DA CÚRCUMA FRENTE A FUNGOS FITOPATÓGENOS.....	47
	CONCLUSÃO.....	51
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

LISTA DE TABELAS

1	Teores de pigmentos curcuminóides e óleo essencial da cúrcuma originária do Brasil e da Índia.....	18
2	Propriedades físico-químicas do óleo essencial da cúrcuma obtidos na Índia e Bangladesh.....	20
3	Propriedades físico-químicas de algumas cetonas sesquiterpênicas do óleo essencial da cúrcuma.....	20
4	Fungos filamentosos padrões da ATCC utilizados no estudo.....	32
5	Concentração do antibiótico anfotericina B impregnado nos discos de papel para as cepas de fungos filamentosos.....	38
6	Rendimento dos óleos essenciais obtidos do rizoma da <i>Curcuma longa</i> L. em pó por hidrodestilação e por extração com hexano.....	40
7	Rendimento dos óleos essenciais obtidos do rizoma da cúrcuma em pó por hidrodestilação e por extração com hexano.....	41
8	Características físico-químicas dos óleos essenciais da <i>Curcuma longa</i> L. obtidos pelos métodos de extração por hidrodestilação e por hexano.....	41
9	Características das substâncias voláteis detectadas no CG nas amostras de óleo essencial de cúrcuma obtidas por hidrodestilação e por extração com hexano.....	45
10	Percentual de substâncias voláteis identificadas por CG nas amostras de óleo essencial de cúrcuma obtidas por hidrodestilação e por extração com hexano.....	47
11	Halos de inibição obtidos para os óleos essenciais da cúrcuma extraídos por hidrodestilação e com hexano e para anfotericina B contra fungos fitopatógenos.....	48

LISTA DE FIGURAS

1	Estrutura química dos pigmentos curcuminóides.....	19
2	Fluxograma do processamento da <i>Curcuma longa</i> L.....	24
3	Curva padrão (concentração x absorbância) para pigmentos curcuminóides.....	43
4	Perfil do processo de extração por hidrodestilação ou hexano no percentual de substâncias voláteis da cúrcuma com 14 a 18 carbonos.....	46
5	Espectros de massa da ar-turmerona e α -turmerona presentes no óleo essencial da cúrcuma.....	46
6	Estrutura das substâncias voláteis ar-turmerona (A) e α -turmerona (B).....	47
7	Crescimento dos fungos filamentosos e halos de inibição do crescimento por óleo essencial de cúrcuma.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABEA	Associação Brasileira de Engenheiros de Alimentos
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ATCC	American Type Culture Collection
BDMC	Bisdesmetoxicurcumina
CC	Cromatografia em coluna
CCF	Cromatografia de camada fina
CG	Cromatografia gasosa
CG/IC	Cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização de chama
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada a detector de espectrometria de massa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CURC	Curcumina
DL ₅₀	Dose letal capaz de matar 50% da população
DMC	Desmetoxicurcumina
DMSO	Dimetilsulfóxido
FAO/WHO	Food and Agriculture Organization/ World Health Organization
FIOCRUZ	Fundação Instituto Oswaldo Cruz
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IDA	Ingestão diária aceitável
IK	Índice de Kovats
JECFA	Joint Expert Committee on Food Additives
MFC	Concentração fungicida mínima
MIC	Concentração inibitória mínima
NCCLS	The National Committee for Clinical Laboratory Standards
PF	Ponto de fusão
pH	Potencial hidrogeniônico
PM	Peso molecular
UV	Ultravioleta

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais da *Curcuma longa* L. obtidos por hidrodestilação e por extração hexânica. Os extratos obtidos foram caracterizados com relação ao rendimento, peso específico, índice de refração, valor éster, pigmentos curcuminóides por espectrofotometria de absorbância UV-visível e substâncias voláteis por CG-EM. A atividade antifúngica contra os fungos fitopatogênicos (*Alternaria brassicicola*, *Aspergillus flavipes*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium sphaerospermum* e *Fusarium oxysporum*) foi investigada pelo método de difusão em ágar utilizando discos. Um maior rendimento de óleos essenciais foi obtido com a extração hexânica, que se mostrou mais simples e rápida comparada a hidrodestilação. Os óleos essenciais obtidos por extração hexânica apresentaram valores significativamente maiores para o peso específico, índice de refração, valor éster e teores de pigmentos curcuminóides. Foram detectadas 26 substâncias voláteis sendo 22 no extrato hidrodestilado e 16 no hexânico. Dentre estas, oito foram identificadas, sendo todas da classe dos terpenos. A turmerona (ar e α) foi a predominante. A atividade antifúngica em ambos extratos foi evidenciada contra *Alternaria brassicicola* e *Aspergillus flavipes* sendo que o extrato hexânico produziu halos de inibição maiores para os dois microrganismos. A atividade antifúngica dos extratos foi afetada pelo método de extração dos óleos essenciais da cúrcuma.

Palavras chave: *Curcuma longa* L., óleos essenciais, atividade antifúngica, extração hexânica; hidrodestilação, CG-EM.

ABSTRACT

PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION AND ANTIFUNGICAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS FROM TURMERIC. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of essential oils from *Curcuma longa* L. obtained by hydrodistillation and by extraction with hexane. The extracts were characterized according to yield, specific weight, refractive index, ester value, curcuminoid pigments by UV-visible spectrophotometry and volatiles by GC-MS. The antifungal activity against phytopathogenic molds (*Alternaria brassicicola*, *Aspergillus flavipes*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium sphaerospermum* and *Fusarium oxysporum*) was investigated by the diffusion in agar method using paper disks. A higher yield of essential oils was obtained with hexane, which was simpler and faster compared to hydrodistillation. The essential oil obtained with hexane had significantly higher specific weight, refractive index, ester value and levels of curcuminoid pigments. 26 volatile compounds were detected. 22 were present in the hydrodistilled extract and 16 in the hexane. 8 were identified as terpenes and turmerone (β and α) was the prevalent. Antifungal activity of both samples was observed against *Alternaria brassicicola* and *Aspergillus flavipes*. Higher antimicrobial activity was provided by the hexanic extract compared to hydrodistillation. There was significant effect of the type of extraction on the antifungal activity.

Key words: *Curcuma longa* L, essential oils, antifungal activity, extraction, hexane, hydrodistillation, GC-MS.

INTRODUÇÃO

As qualidades anti-sépticas de plantas aromáticas e medicinais e de seus extratos vêm sendo reconhecidas desde a antiguidade, tendo os óleos essenciais merecido destaque especial com relação a estas atividades.

Os óleos essenciais são geralmente isolados de plantas por métodos de destilação por vapor ou hidrodestilação. São essencialmente misturas variadas de terpenóides, especificamente monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), alguns diterpenos (C20) e uma grande variedade de hidrocarbonetos alifáticos de baixo peso molecular (lineares, ramificados, saturados e insaturados). Terpenos são os principais responsáveis químicos pela fragrância e pelos usos medicinais e culinários de plantas (DORMAN & DEANS, 2000). As propriedades antimicrobianas de óleos essenciais extraídos de plantas e de seus constituintes foram estudadas por vários autores.

Pesquisas da atividade antimicrobiana, modo de ação e uso potencial de óleos essenciais de plantas tem ganhado importância. Atualmente, a avaliação de propriedades antimicrobianas de óleos essenciais abrange uma grande variedade de microrganismos contra os quais têm sido testados, incluindo microrganismos deteriorantes de alimentos (ZAIKA et al., 1983; CONNOR & BEUCHAT, 1984; JANSSEN et al., 1988; OUATTARA et al., 1997), microrganismos produtores de toxinas alimentares (BEUCHAUT, 1976; THARIB et al., 1983; DEANS & RITCHIE, 1987; LIS-BALCHIN & DEANS, 1997), fungos filamentosos micotoxigênicos (KNOBLOCH et al., 1989), fungos patogênicos, leveduras dimórficas (BOONCHILD & FLEGEL, 1982; GHANNOUM, 1988) e vírus de plantas e animais (IEVEN et al., 1982; ROMERIO et al., 1989).

A *Curcuma longa* L. planta muito empregada na culinária também vem sendo estudada em relação à composição química e atividades farmacológicas. Seus rizomas fornecem um pó amarelo aromático muito empregado como condimento e corante na indústria alimentícia, utilizado na medicina popular e também como repelente de insetos (TALLON-NETTO, 2004; PÉRET-ALMEIDA, 2006). Do rizoma da cúrcuma também podem ser extraídos os óleos essenciais, de grande interesse para a indústria alimentícia. Os óleos essenciais da cúrcuma são compostos por turmeronas e por cetonas aromáticas em menor proporção.

Propriedades antioxidantes e antimicrobianas dos óleos essenciais da cúrcuma foram descritas na literatura (JITOE et al., 1992; SINGH et al., 2002ab; PÉRET-ALMEIDA

et al., 2003). Resultados promissores foram obtidos por PÉRET-ALMEIDA et al. (2003) na avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de rizoma de cúrcuma contra fungos, especificamente *Aspergillus niger* e *Saccharomyces cerevisiae* utilizando extrato obtido por hidrodestilação. Esse estudo constitui um incentivo para a continuidade da investigação da atividade dos óleos essenciais utilizando fungos filamentosos fitopatógenos de importância na agricultura.

Os fungos fitopatógenos são agentes causadores de doenças em vegetais acarretando perdas significativas na agricultura, destruição de grãos durante a estocagem, diminuição do valor nutritivo e, algumas vezes, produção de micotoxinas prejudiciais ao homem e aos animais (VELLUTI et al., 2004). Sendo assim, os óleos essenciais poderiam ser um meio alternativo com potencial antifúngico na preservação de alimentos.

Este trabalho teve como objetivo verificar a eficiência de dois métodos de extração de óleos essenciais (hidrodestilação e extração com hexano) comparando a composição química e a atividade antimicrobiana para fungos fitopatógenos.

Os objetivos específicos foram:

- (i) caracterização físico-química das amostras de óleos essenciais obtidos a partir da cúrcuma em pó utilizando os dois diferentes métodos de extração;
- (ii) caracterização das substâncias voláteis da amostra através de cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização de chama (GG/IC) e identificação por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM);
- (iii) avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais frente a alguns fungos fitopatógenos.

REVISÃO DE LITERATURA

1 CÚRCUMA

1.1 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS

A cúrcuma 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. De cultivo fácil, apresenta a vantagem de não exigir tratamentos culturais especiais, podendo desenvolver-se em condições tropicais, em altitudes que variam do nível do mar a 1500 m, e 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 (GOVINDARAJAN, 1980; MILÁN, 1992; SCARTEZZINI & SPERONI, 2000). Seu uso foi introduzido pelos mercadores árabes, na Idade Média, quando a cúrcuma era reconhecida como “açafraão indiano” (RICHARD & LOO, 1992).

A planta apresenta geralmente cinco a sete folhas grandes de coloração verde, que exalam um odor agradável quando contusas. 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 (CORREA, 1975; HERTWIG, 1986; CECÍLIO-FILHO, 1996; PÉRET-ALMEIDA, 2000).

A cúrcuma é facilmente reconhecida pela inflorescência amarelada em espiga sendo que a floração ocorre geralmente 180 dias após o plantio (GONVIDARAJAN, 1980; ESPINOSA et al., 1994). Os rizomas são tuberosos de centro arredondado com laterais alongadas de coloração alaranjada crescendo abaixo do solo e que, agrupados, formam uma estrutura chamada mão (MAIA, 1991; TAINTER & GRENIS, 1996; SCARTEZZINI & SPERONI, 2000).

A propagação da cúrcuma em plantios comerciais é assexuada vegetativa. O plantio pode se dar diretamente no solo por meio do bulbo (rizomas primários) ou por meio dos rizomas secundários conhecidos como “dedos” ou “piões” originados dos primeiros (MAIA et al., 1995). Segundo estes pesquisadores, as plantas originárias dos rizomas primários dão maiores rendimentos do que aquelas provenientes dos rizomas secundários, mas o teor de pigmentos dos novos rizomas não é alterado pelo tipo de

rizoma utilizado no plantio. O plantio ocorre nos meses de agosto a setembro e os rizomas podem ser colhidos, dependendo das condições climáticas, de seis a dez meses após o cultivo (AÇAFRÃO..., 1991; MARTINS & RUSIG, 1992). Os caules são anuais, emergem das gemas dos rizomas e depois do florescimento, completam o ciclo vegetativo, amarelecem e morrem (CORREA, 1975).

O gênero *Curcuma* é constituído por centenas de espécies de plantas (GOVINDARAJAN, 1980). No Brasil a *Curcuma longa* L. é conhecida como cúrcuma, batatinha amarela, gengibre dourado, mangarataia, açafraão da terra ou açafraão da Índia. Na Índia é denominada *haldi*, nas Filipinas *dilau*, na Alemanha *gelbwurzel* e *gurgemei*, na França *safran des Indes* e *souchet des Indes* e em países de língua inglesa *turmeric* e *yellow root* (CORREA, 1975; GOVINDARAJAN, 1980; MARTINS & RUSIG, 1992; MILÁN, 1992).

Com produtividade de 22 ton de rizomas/ha, a Índia é o principal produtor mundial. No Brasil é cultivada principalmente nos estados de Goiás, Mato Grosso e São Paulo com produtividade de 12 ton/ha. Em estudos realizados na Universidade Federal de Lavras, obteve-se uma produção de 25 ton/ha (CECÍLIO-FILHO, 1996).

A Índia detém cerca de 50% da produção mundial (90 mil ton) de cúrcuma. O Chile é o maior produtor da América do Sul e a produção brasileira corresponde a 1% da produção mundial, mas com uma grande vantagem: a colheita no Brasil é feita justamente na entressafra indiana. Os maiores importadores são os Estados Unidos, Alemanha, Japão e Holanda. O Brasil também importa 100 a 200 ton/ano (AGÊNCIA ..., 2006).

1.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Fatores como a planta matriz, tipo de solo, adubação, disponibilidade de água, época de colheita, tempo de armazenamento, dentre outros, podem influenciar a composição química dos rizomas de cúrcuma (OLIVEIRA et al., 1992; SCARTEZZINI & SPERONI, 2000).

O componente presente em maior teor (25 a 50%) é o amido, seguido de proteína (4 a 10%), fibras e cinzas (2 a 7%), pigmentos curcuminóides e os óleos essenciais (GOVINDARAJAN, 1980). Estudos realizados por SOUZA & GLÓRIA (1998) com amostras de cúrcuma de vários municípios de Minas Gerais, mostraram teores semelhantes de pigmentos curcuminóides e óleos essenciais aos encontrados por GOVINDARAJAN (1980) para produtos indianos. Os resultados obtidos por TALLON-

NETTO (2004) aproximam-se também dos valores estabelecidos para a cúrcuma indiana (tabela 1).

TABELA 1: Teores de pigmentos curcuminóides e óleo essencial da cúrcuma originária do Brasil e da Índia

ORIGEM	PIGMENTOS CURCUMINÓIDES (mg/100 g)	ÓLEO ESSENCIAL (mg/100 g)
Brasil ¹	5,52	3,65
Brasil ²	4,41	3,07
Índia ³	5,0	5,8

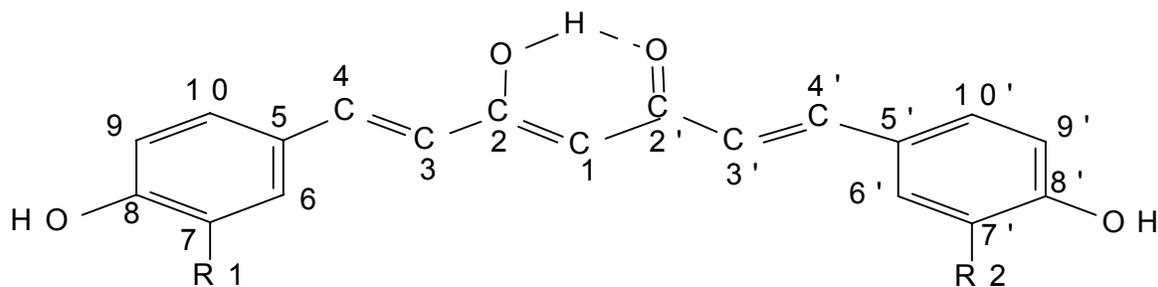
Fontes: ¹ TALLON-NETTO (2004); ² SOUZA & GLÓRIA (1998); ³ GOVINDARAJAN (1980).

1.2.1 Pigmentos curcuminóides

Os teores dos pigmentos curcuminóides podem variar de 4 a 8 mg/100 g no rizoma da cúrcuma. As variações quanto aos teores podem ser devidas às diferenças relativas às variedades ou cultivares, bem com ao desenvolvimento do bulbo e às práticas culturais (MATHAI, 1976). Inclusive, de acordo com GOVINDARAJAN (1980), o teor dos pigmentos pode ser aumentado no rizoma quando este é mantido por mais tempo no solo.

Os pigmentos curcuminóides encontrados na cúrcuma são: a curcumina (CURC), a desmetoxicurcumina (DMC) e a bisdesmetoxicurcumina (BDMC). As concentrações variam de 4 a 6 mg/100 g, 4 a 3 mg/100 g e 3 a 2 mg/100 g, respectivamente (MARTINS & RUSIG, 1992).

A curcumina ($C_{21}H_{20}O_6$), desmetoxicurcumina ($C_{20}H_{18}O_6$) e bisdesmetoxicurcumina ($C_{19}H_{16}O_4$) apresentam absorções máximas nos comprimentos de onda de 429, 424 e 419 nm, respectivamente, e apresentam fluorescência amarela sob luz ultravioleta. O espectro de fluorescência é de 434 nm de excitação e 520 nm de emissão (SOUZA, 1993; PÉRET-ALMEIDA et al., 2005). Em relação ao peso molecular (PM) e ao ponto de fusão (PF), GOVINDARAJAN (1980) relatou serem estes para os respectivos pigmentos: PM = 368, PF = 183 °C; PM = 330, PF = 168 °C e PM = 308, PF = 224 °C. Os pigmentos curcuminóides, de acordo com PÉRET-ALMEIDA et al. (2005), se diferenciam pelo número de grupos metóxi (CH_3) ligados a sua estrutura conforme indicado na figura 1.



Compostos	R1	R2
Curcumina	OMe	OMe
Desmetoxicurcumina	H	OMe
Bisdesmetoxicurcumina	H	H

Figura 1: Estrutura química dos pigmentos curcuminóides.

Fonte: PÉRET-ALMEIDA et al. (2005).

Para separação dos pigmentos curcuminóides destaca-se a cromatografia de camada fina (CCF) e a cromatografia em coluna (CC) (GOVINDARAJAN, 1980; JITOE et al., 1992; OSAWA et al., 1995; AMARAL, 2000).

TAKAHASHI (1987) revelou que o método mais utilizado para detecção da presença de curcumina em produtos alimentícios baseia-se na reação com o ácido bórico, a qual gera dois compostos de coloração vermelha: a rubrocurcumina e rosocianina. A extração é feita com etanol por refluxo, e a quantificação dos teores de pigmentos curcuminóides totais por leitura em espectrofotômetro a 425 nm de absorbância.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido empregada para a separação, identificação e quantificação dos pigmentos curcuminóides. O método é rápido e pode solucionar problemas relativos à decomposição fotoquímica e oxidativa (PÉRET-ALMEIDA, 2000; TALLON-NETTO, 2004).

1.2.2 Óleos essenciais

São constituídos por álcoois sesquiterpênicos e cetonas, produtos secundários do metabolismo vegetal nas células glandulares ou epiteliais. Os óleos ficam retidos em vacúolos citoplasmáticos podendo ser rompidos por danos mecânicos ou físico-químicos. Apresentam baixo ponto de ebulição e um forte aroma (HESS, 1975). Seus principais componentes são: turmerona (35%), ar-turmerona (12%), α e β -zingibereno (25%), 1-8 cineol (1%), sabineno (0,6%) e borneol (0,5%) (VIASAN et al., 1989; MATA et al., 2004).

Segundo RUPE et al. (1934) e RUPE & GASSMANN (1936) o *flavor* da cúrcuma é devido às cetonas sesquiterpênicas formadas por aproximadamente 59% de ar-turmerona e turmerona, numa proporção de 40 e 60%, respectivamente. Observaram também a presença de 6% de álcool sesquiterpênico.

O óleo essencial da *C. longa* possui diferentes propriedades físico-químicas que estão apresentadas na tabela 2. Os diferentes valores encontrados podem ser atribuídos a variações da matéria-prima, tempo de destilação ou grau de maturação das amostras antes da análise (GOVINDARAJAN, 1980). As características físico-químicas de algumas cetonas sesquiterpênicas estão resumidas na tabela 3.

TABELA 2: Propriedades físico-químicas do óleo essencial da cúrcuma obtidos na Índia e Bangladesh

PROPRIEDADES	ÓLEO ESSENCIAL DE CÚRCUMA DA	
	Índia ¹	Bangladesh ²
Teor (g/100 g)	5,8	4,5
Peso específico (g/mL)	0,929 a 20°C	0,928 a 31°C
Índice de refração (a 30 °C)	1,5054	1,5053
Ângulo de rotação óptica (a 30 °C)	-17,3	-25,5
Valor éster (mg de KOH/g)	3,2	6,5
Valor acetil (mg de KOH/g)	26,3	27,4
Solubilidade	*	Álcool

Fontes: ¹ KELKAR & RAO (1934); ² KHALIQUE & DAS (1968), * dado não disponível.

TABELA 3: Propriedades físico-químicas de algumas cetonas sesquiterpênicas do óleo essencial da cúrcuma

PROPRIEDADES	Turmerona	Ar-turmerona
Fórmula molecular	C ₁₅ H ₂₂ O	C ₁₅ H ₂₀ O
Peso molecular	218	216
Ponto de ebulição (°C/10 mmHg)	125-126	159-160
Índice de refração	n ²⁵ D 1,5960	n ²⁰ D 1,5219
Rotação óptica	n ²⁵ D -69,70	α ²⁵ D + 84
Absorção máxima (nm)	234-235	239

Fonte: GOVINDARAJAN (1980).

OGUNTMEIN et al. (1990) investigaram os constituintes do óleo essencial das folhas de *C. longa*. O óleo apresentou, predominantemente, monoterpenos, sendo os principais o α-felandreno (47,7%) e o terpinoleno (28,9%). Salientaram ainda que os

maiores constituintes do óleo essencial do rizoma, turmerona e ar-turmerona não foram encontrados no óleo essencial das folhas. Os resultados obtidos por SHARMA et al. (1997) mostraram uma diferença quantitativa marcante entre os óleos dos rizomas e folhas. Os principais constituintes dos óleos dos rizomas foram: a ar-turmerona (16,7-25,7%), α -turmerona (30,1-32,0%) e β -turmerona (14,7-18,4%), enquanto que estes mesmos compostos foram encontrados em quantidades traços nas folhas.

Os resultados obtidos ZWAVING & BOS (1992), que também estudaram a composição dos óleos essenciais dos rizomas de espécies diferentes do gênero *Curcuma* mostraram diferenças na composição química e na proporção das substâncias voláteis entre as espécies estudadas. Com relação a *C. longa*, verificaram a presença de ar-turmerona, turmerona e turmerol (cerca de 75%) e outros constituintes como ar-curcumeno, β -curcumeno, β -sesquifelandreno e α -atlantona.

De acordo com RICHMOND & POMBO-VILLAR (1997), além das cetonas sesquiterpênicas, o extrato do óleo essencial de rizomas da *C. longa* contém uma série de ácidos graxos saturados e insaturados.

A oleoresina, produto viscoso, laranja-amarronzado, com aroma fresco e pungente e sabor amargo é composta de óleo essencial e pigmentos, materiais resinosos não voláteis além de outros componentes ativos (MILÁN, 1992; WONG, 1995).

Devido à simplicidade e baixo custo, os métodos de extração do óleo essencial da cúrcuma mais utilizados são a hidrodestilação e a extração com hexano (SIMÕES et al., 2000).

A proporção dos numerosos compostos voláteis presentes, bem como suas interações, determina o *flavor* característico de um alimento. Dentre as classes de voláteis mais encontrados nos alimentos estão os ésteres, álcoois, ácidos, aldeídos, cetonas e terpenos (WONG, 1995; OGA, 1996), sendo estes últimos os responsáveis pelo *flavor* da cúrcuma e presentes no óleo essencial e na oleoresina da cúrcuma.

Nos rizomas de cúrcuma, os teores de óleos essenciais variam entre 2,5 a 7,0%. A extração pode ser feita por destilação ou extração com solvente apolar do rizoma fatiado. A coloração varia de amarelo pálido a amarelo alaranjado e o odor é característico (KRISHNAMURTHY et al., 1976; VIASAN et al., 1989; LEUNG & FOSTER, 1996).

1.3 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

Em 1990, estudiosos pertencentes ao Joint Expert Committee in Food Additives (JECFA) da FAO/WHO chegaram à conclusão de que a cúrcuma é mais especificamente

um alimento do que um aditivo, e, portanto, não é apropriado designar-lhe uma ingestão diária aceitável (IDA) (SOUZA,1993). Para a curcumina, estabeleceu-se uma IDA de 0,1 mg/kg de peso corpóreo e, para a oleoresina, de 0 a 0,3 mg/kg de peso corpóreo. Entretanto, no encontro realizado em 1995, foi estabelecida uma IDA temporária de 0 a 1 mg de curcumina/kg de peso corpóreo, que foi estendida até o encontro de 2001, sendo válida até o ano de 2003 (FAO, 2001). De acordo com o JECFA (2006), a situação atual é a seguinte: a curcumina teve sua IDA estabelecida de 0 a 3 mg/kg de peso corpóreo, já a cúrcuma e a oleoresina não possuem uma IDA especificada.

A toxicidade oral aguda da cúrcuma é baixa; por exemplo, a dose letal 50% (DL₅₀) oral de oleoresina de cúrcuma, para ratos está acima de 10 g/kg de peso corporal (HALLAGAN et al., 1995) e a DL₅₀ oral de curcumina para camundongos é superior a 2 g/kg de peso corpóreo (SRIMAL & DHAWAN, 1973).

1.4 PROCESSAMENTO

O processamento da cúrcuma pode variar de acordo com o país. No Brasil, em geral, os rizomas frescos são lavados, fatiados e secos ao sol; enquanto, na China, são cozidos antes da secagem. Na Jamaica, após a limpeza, realiza-se o cozimento em autoclave seguida de secagem em secador de grãos. Por outro lado, na Índia os rizomas são limpos cozidos, fatiados, secos ao sol e polidos (GOVINDARAJAN, 1980; SAMPATHU et al., 1988). A cocção facilita o processo de secagem, promovendo a gelatinização do amido e a uniformidade da cor do produto. Entretanto, GOVINDARAJAN (1980) observou que o aquecimento poderia provocar alterações nos compostos flavorizantes do óleo essencial da cúrcuma. TALLON-NETTO (2004) efetuou o branqueamento da cúrcuma em pH 3, 5, 7 e 9 durante 20 minutos e utilizou como controle, amostras não cozidas. Foi verificado que o branqueamento diminuiu significativamente o tempo de secagem dos rizomas em relação às amostras não submetidas ao branqueamento. O pH 7,0 foi o único, dentre os pesquisados, em que não houve perda significativa de pigmentos em relação ao controle, constituindo, portanto, no tratamento mais indicado. O pigmento menos sensível ao efeito do pH foi a bisdesmetoxicurcumina, ao passo que o mais sensível foi a curcumina. O pH 9,0 foi o mais prejudicial, no qual as perdas de curcumina e desmetoxicurcumina foram maiores. Este trabalho também mostrou que o branqueamento afetou os teores de óleo essencial. A ordem decrescente da quantidade de óleo essencial encontrada foi: controle = pH 9,0 > pH 7,0 > pH 5,0 = pH 3,0.

A secagem dos rizomas pode ser feita em áreas de terra batida ou cimentada para a realização de secagem ao sol. O processo de secagem dura de 10 a 15 dias quando os rizomas tornam-se duros e quebradiços. Para obter secagem mais rápida, pode-se empregar secadores com circulação de ar. Nestes, a secagem dos rizomas frescos pode ocorrer em 75 horas e dos rizomas cozidos em 48 horas à temperatura de 65 °C (GOVINDARAJAN, 1980). O rizoma adquire então uma superfície rugosa e esta aparência é melhorada com um polimento. Alguns países importadores, principalmente os orientais, dão preferência para a forma polida (MILÁN, 1992; TAINTER & GRENIS, 1996).

De acordo com PÉRET-ALMEIDA (2000), o processamento ideal da cúrcuma, inicia-se com a colheita, seguido pela lavagem e seleção dos rizomas. Em seguida, passa pelo processo de branqueamento em água fervente por 10 minutos. São fatiados, desidratados a 60 °C, triturados e peneirados em tamis de 40 mesh antes da embalagem e comercialização. O fluxograma com as principais etapas do processamento da *C. longa* pode ser observado na figura 2.

Os rizomas fatiados e secos são embalados em sacos plásticos duplos. A cúrcuma em pó é empacotada a granel em recipientes de fibra de vidro ou de metal, a fim de evitar a perda da cor, dos óleos essenciais e a absorção de umidade. No varejo, o pó pode ser encontrado em embalagens plásticas ou de vidro (ABEA, 1984; MILÁN, 1992). A oleoresina é estocada em recipientes de poliolefinas, ao abrigo da luz e do calor, após homogeneização para garantir a uniformidade do produto (McCARRON, 1972; WONG, 1995).

Comercialmente, segundo a ABEA (1984), a cúrcuma encontra-se disponível na forma inteira (rizomas secos), moída (em pó), como oleoresina (extrato de pigmentos curcuminóides e óleos essenciais) e curcumina purificada (MILÁN, 1992).

À oleoresina são incorporados diluentes ou emulsificantes, como polissorbato, propilenoglicol ou óleo vegetal, resultando em extratos hidro ou lipossolúveis (MILÁN, 1992). O uso da oleoresina tem aumentado significativamente na indústria de alimentos, especialmente em alimentos congelados semi-prontos, molhos e cremes devido à facilidade de mistura, sabor uniforme e economia (FERREIRA, 1991).

O rizoma da *C. longa* possui papel importante como agente corante em alimentos, cosméticos, indústria farmacêutica e têxtil (GOVINDARAJAN, 1980; FARMACOPÉIA..., 1988). Dados têm sido publicados, sobre o uso do rizoma na indústria de alimentos, devido as suas propriedades aromatizantes, antioxidantes, e como repelente de insetos,

para proteção de grãos, principalmente trigo, arroz, cevada e durante a estocagem do milho por ação mecânica (JASIM & ALI, 1992).



Figura 2: Fluxograma do processamento da *Curcuma longa* L.

Fonte: Adaptado de PÉRET-ALMEIDA (2000).

1.5 USO EM ALIMENTOS

A cor da cúrcuma em pó pode variar do amarelo brilhante ao laranja escuro, dependendo da variedade. Nos Estados Unidos a cor amarela brilhante é valorizada para o uso em formulações de picles e pastas de mostarda. A cor laranja escura é apreciada pelos imigrantes indianos e asiáticos em pratos típicos na Inglaterra (GOVINDARAJAN, 1980). A cúrcuma em pó nada mais é do que o rizoma cozido, seco e triturado.

O aroma da cúrcuma é valorizado nos Estados Unidos e outros países do Ocidente nas formulações do *curry* (GOVINDARAJAN, 1980). Além disso, o uso da cúrcuma tem despertado interesse como antioxidante e como agente terapêutico (JASIM & ALI, 1992).

A cúrcuma tem um odor forte, penetrante, picante e um sabor ligeiramente amargo, semelhante ao do gengibre. É um condimento de grande importância na culinária no preparo de aves ensopadas, nas preparações apimentadas, nos molhos, ovos mexidos, omeletes, patê de fígado, salada e caranguejo. O aroma característico da cúrcuma é de interesse nas pastas de mostarda e em formulações de condimentos como *curry*, pickles, maioneses e alimentos processados congelados prontos para consumo (GOVINDARAJAN, 1980; ABEA, 1984; RICHARD & LOO, 1992; JAYAPRAKASHA et al., 2005).

A oleoresina, obtida da cúrcuma em pó, por extração com solventes como álcool e acetona, apresenta cor, sabor e aroma concentrados (FREUND et al., 1988; MILÁN, 1992). O produto obtido é viscoso e de cor marrom alaranjada (FREUND et al., 1988).

Quando purificado, o extrato da curcumina, de custo elevado corresponde ao corante sem aroma ou sabor residual, obtido por extração com solvente (álcool) de cúrcuma em pó e purificado por cristalização. O produto, na verdade, consiste não só de curcumina (CURC), mas também, de desmetoxicurcumina (DMC) e bisdesmetoxicurcumina (BDMC) em proporções variáveis (TAKAHASHI, 1987). O extrato assim obtido pode ser hidrossolúvel ou lipossolúvel, sendo associado a agentes emulsificantes ou preparado com óleos vegetais, respectivamente (FREUND et al., 1988). A sua utilização é preferida em produtos alimentícios, nos quais o aroma da cúrcuma é indesejável, como por exemplo, gelatinas, manteiga, sorvetes de baunilha, iogurtes de limão, doces, picolés, queijos, margarinas, gorduras alimentícias, certos licores e produtos de confeitaria (PEROTTI, 1975; RICHARD & LOO, 1992; HENDRY & HOUGHTON, 1996). O extrato de curcumina purificado é utilizado primariamente em produtos sólidos, misturas desidratadas, cereais e produtos de panificação (FREUND et al., 1988).

1.6 PROPRIEDADES FUNCIONAIS

A cúrcuma vem sendo utilizada há mais de 6.000 anos pela medicina indiana, tradicional no emprego de substâncias naturais. Usualmente é utilizada para o tratamento de doenças de pele, para aliviar distúrbios estomacais, doenças do fígado e em resfriados (NADKARNI & NADKARNI, 1976; AMMON & WAHL, 1991; ROTH et al., 1998). Pode ainda ser utilizada como antiinflamatório, antiartrítico, regulador das funções biliares e

reduzidor dos níveis de colesterol (CHANDRA & GUPTA, 1972; DUKE, 1997; GOOLDWYN, 1997; CECÍLIO-FILHO et al., 2000). GOVINDARAJAN (1980) inclusive cita o poder afrodisíaco da cúrcuma. Na China, têm papel eficaz no tratamento de certos distúrbios circulatórios, como angina e coágulos sangüíneos originários de traumas, de cólicas menstruais e dores relacionadas à insuficiência circulatória (SAN LIN, 1994).

Apresenta também atividades *in vitro* antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatória, anticancerígena e antiprotozoária (GOVINDARAJAN, 1980; GOYAL & KORLA, 1993; RAMIREZ-TORTOSA et al., 1998; LEE et al., 2003). De acordo com SUI et al. (1993), a curcumina apresentou ação inibidora moderada sobre enzimas proteolíticas dos vírus da AIDS HIV-1 e HIV- 2. Também foi observado o efeito antidepressivo do extrato aquoso do rizoma da cúrcuma administrado oralmente em camundongos com dosagem de 140 a 150 mg/kg por 14 dias (YU et al., 2002), bem como o efeito protetor das células neurais no desenvolvimento do mal de Alzheimer (KIM & KIM, 2001).

O poder funcional antioxidante da cúrcuma pode ser atribuído principalmente aos componentes fenólicos. Os pigmentos curcuminóides e os óleos essenciais têm sido considerados os responsáveis por esta atividade (LACHANCE & GUHR, 1997).

1.6.1 Propriedades antimicrobianas

Vários autores relataram à atividade antimicrobiana da cúrcuma (rizoma). Em testes conduzidos por LUTOMSKI et al. (1974), o extrato alcoólico promoveu a inibição do crescimento do *Aspergillus parasiticus*. Extratos etéreos e clorofórmicos de cúrcuma apresentaram atividade antifúngica *in vitro* para os fungos *Trichophyton verrucosum*, *T. mentagrophytes* e *T. simii* (MISRA & SAHU, 1977).

APISARIYAKUL et al. (1995) e SINGH et al. (2002b) citaram baixa atividade *in vitro* de diferentes frações da cúrcuma contra os fungos patogênicos *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*, *Sporothrix schenckii*, *Curvularia palliscens*, *Colletotricum falcatum*, *A. niger* e *A. terreus*.

De acordo com BHAVANISHANKAR & MURTHY (1979), o extrato etanólico da curcumina apresentou atividade antimicrobiana *in vitro* contra o microrganismo *Staphylococcus aureus* na concentração de 2,5 a 50 mg/100 mL.

SINGH et al. (2002b), trabalhando com óleo essencial da cúrcuma *in vitro* obtido por hidrodestilação, verificaram a inibição de bactérias quando o óleo era empregado sem diluição. Comparativamente ao antibiótico gentamicina (30 mg), os resultados obtidos em

relação à atividade antimicrobiana foram: *S. aureus* 36%, *S. epidermidis* 90%, *Escherichia coli* 18%, *Pseudomonas aeruginosa* 22% e *Salmonella typhimurium* 31%.

KIM et al. (2003) realizaram testes *in vivo* com uma suspensão de curcumina em água e tween 80 na concentração de 250 mg/L. Esta suspensão apresentou atividade antifúngica nas proporções de 85, 78 e 45% em relação ao fungicida sintético clorotalonil (50 mg) para *Phytophthora infestans*, *Puccinia recondita* e *Rhizoctonia solani*, respectivamente.

LEE et al. (2003) verificaram que a ar-turmerona isolada da fração hexânica obtida do rizoma, quando testada *in vitro*, na concentração de 500 µg/mL, apresentou atividade antifúngica para os fungos *P. infestans* e *Erysiphe graminis*.

PÉRET-ALMEIDA et al. (2003) verificaram atividade antifúngica *in vitro* de óleos essenciais obtidos por hidrodestilação para *A. niger* e *Saccharomyces cerevisiae*, em comparação com o antibiótico anfotericina B. Em relação aos fungos testados, os diâmetros dos halos de inibição obtidos com os óleos essenciais sem diluição variaram de 6,76 a 12,0 mm e 6,18 a 11,55 mm, respectivamente. Quando os halos de inibição foram comparados com o antibiótico (controle positivo) nas concentrações de 5 e 10 µg observou-se que os halos produzidos pelo antibiótico foram menores que os produzidos pelas amostras com variação de 11,21 a 11,38 mm e 10,08 a 10,10 mm, respectivamente para os fungos testados. Entretanto não ficou claro qual ou quais as substâncias presentes no óleo essencial da cúrcuma seriam responsáveis pela atividade antimicrobiana.

Os monoterpenos, sesquiterpenos entre outras substâncias, têm sido relatados como substâncias presentes em óleos essenciais com potencial atividade antimicrobiana (COWAN, 1999). De acordo com SINGH et al. (2002 a,b), substâncias presentes no óleo essencial da cúrcuma apresentaram atividade contra bactérias e fungos: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *Candida albicans*, *Fusarium moniliforme*, *C. pallencens*, *F. oxysporum*, *C. falcatum* e *A. niger*.

SACCHETTI et al. (2005) estudaram *in vitro* 11 óleos essenciais solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) de diferentes plantas incluindo entre elas a *C. longa* em concentrações de 0,01 a 0,75 mg/mL. Os estudos foram realizados de forma a avaliar os extratos de óleos de diferentes vegetais como antioxidantes, anti-radicaais livres e antimicrobianos funcionais em alimentos. De acordo com os resultados obtidos muitos dos óleos essenciais mostraram uma moderada atividade inibidora contra as leveduras: *C. albicans*, *Rhodotorula glutinis*, *S. pombe*, *S. cerevisiae* e *Yarrowia lypolitica*. A atividade antimicrobiana foi expressa como a concentração inibitória mínima (MIC - menor

concentração do óleo essencial que mostra uma zona de inibição clara). O óleo essencial da cúrcuma apresentou os seguintes valores de MIC: 0,36 mg/mL para *C. albicans*, 0,18 mg/mL para *R. glutinis* e *S. cerevisiae*; 0,06 mg/mL para *S. pombe* e 0,15 mg/mL para *Y. lipolytica*. De acordo com os autores, os diferentes perfis dos óleos essenciais podem estar ligados a diferenças na sua composição química. Segundo SACCHETTI et al. (2005), leveduras e fungos são marcadamente inibidos por óleos ricos em fenóis, aldeídos e álcoois.

Sendo assim, verificou-se na literatura que a maioria dos estudos *in vitro* realizados para a avaliação da atividade antimicrobiana da cúrcuma foi feita com extratos da cúrcuma em pó, com a curcumina comercial, e com óleos essenciais. Em relação aos óleos essenciais, nos trabalhos de SINGH et al. (2002 a,b); LEE et al. (2003); PÉRET-ALMEIDA et al. (2003) e SACCHETTI et al. (2005) não houve comparação entre os métodos de extração e a atividade antifúngica associada a cada extrato.

Em relação à atividade antimicrobiana do óleo essencial da cúrcuma, esta foi verificada para bactérias e para fungos, vários de interesse humano e outros de interesse na área de alimentos. Mas seria interessante explorar o potencial antimicrobiano dos óleos essenciais para mais fungos fitopatógenos, os quais são relevantes na deterioração de alimentos como grãos e vegetais. Nesse sentido procurou-se identificar espécies disponíveis de interesse na agricultura para a continuidade dos estudos com óleos essenciais da cúrcuma.

2 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Uma grande variedade de métodos pode ser empregada para medir a atividade *in vitro* de microrganismos contra os agentes antimicrobianos. Os principais métodos microbiológicos de detecção de atividade antimicrobiana encontrados na literatura tanto para detecção da atividade de bactérias como fungos e leveduras podem ser classificados em três tipos: ensaios bioautográficos, de difusão e de diluição (RIOS et al., 1988).

Os ensaios bioautográficos são aqueles que empregam placas de cromatografia de camada fina (CCF) para a análise. Os compostos separados por CCF são colocados por contato em placas de ágar previamente inoculadas com o microrganismo teste. Zonas de inibição de crescimento microbiano indicam a presença de substâncias antimicrobianas (RIOS et al., 1988; BRANDÃO, 2004). Estes métodos têm importância particular na pesquisa de compostos antimicrobianos vegetais, pois permitem a localização direta dos

constituintes ativos a partir de uma matriz complexa sendo, portanto, um método qualitativo (HOSTETTMANN & MARSTON, 1994).

Os ensaios de difusão são métodos quantitativos, nos quais o efeito pode ser graduado. Fundamentam-se na difusão da substância a ser ensaiada, em um meio de cultura sólido e inoculado com o microrganismo. A partir da difusão ocorre o aparecimento de um halo, no qual não há crescimento do microrganismo, denominado halo de inibição. Diferentes tipos de reservatórios podem ser empregados incluindo discos de papel, cilindros de porcelana ou de aço inoxidável e orifícios feitos no meio de cultura (VANDENBERGHE & VLIETINCK, 1991). A substância ou extrato a ser testado é colocado em contato com o meio de cultura inoculado, e a maneira como se processa esse contato define os diferentes métodos de difusão, dentre eles, método do disco difusão, método dos cilindros e método dos orifícios (RIOS et al., 1988).

No método do disco difusão, uma suspensão padronizada do microrganismo a ser testada (escala Mc Farland ou espectrofotômetro) é inoculada na superfície do ágar e discos de papel, contendo concentrações dos antimicrobianos a serem testados são colocados nessa superfície. Após a incubação, os diâmetros dos halos de inibição produzidos são medidos com paquímetro ou outro instrumento apropriado. A resposta do microrganismo será uma função direta do log da concentração da substância teste ou do antibiótico (BRANDÃO, 2004). Dentre as técnicas de difusão, esse método é o mais adequado para se trabalhar com extratos vegetais coloridos e ou extraídos com solventes orgânicos, pois é possível evaporar o solvente do disco, antes da colocação deste no meio de cultura (RIOS et al., 1988) e a cor não irá interferir na leitura dos resultados.

Neste método, entretanto, a presença de matéria particulada na amostra pode interferir na difusão da substância antimicrobiana no ágar. Mas, o pequeno volume necessário e a possibilidade de testar de cinco a seis compostos por placa frente a um único microrganismo são vantagens observadas quando esse é empregado (VANDENBERGHE & VLIETINCK, 1991).

Ensaio de diluição são aqueles nos quais os extratos ou substâncias a serem testadas são adicionados a um meio de cultura líquido, previamente inoculado com o microrganismo teste. Após incubação, o crescimento do microrganismo é determinado pela leitura visual direta ou turbidimétrica pelo uso de espectrofotômetro em comprimento de onda apropriado (VANDENBERGHE & VLIETINCK, 1991).

O método de diluição em meio líquido é o que apresenta metodologia mais complicada, entretanto é o mais sensível. Esse método é recomendado na determinação da MIC (RIOS et al., 1988). A MIC é a menor concentração do agente antimicrobiano

capaz de inibir completamente o crescimento do microrganismo em tubos ou placas de microdiluição (NCCLS, 1993).

Concentrações decrescentes do agente antimicrobiano são colocadas em tubos ou placas de microtítulo com 96 poços contendo meio de cultura com o inóculo padronizado e estes são, em seguida, incubados. As placas de microtítulo têm a vantagem de nelas poderem ser testadas três ou mais concentrações de uma mesma substância e diferentes microrganismos (VADENBERGHE & VLIETINCK, 1991). A resposta do microrganismo é evidenciada pela turvação do meio no qual é medida a transmitância em espectrofotômetro. Quanto maior a concentração do microrganismo testado, maior será o valor da leitura em transmitância (BRANDÃO, 2004).

De acordo com a literatura, pode-se empregar um sal de tetrazólio de coloração amarela como reagente de coloração para evidenciar a viabilidade celular de células bacterianas com leitura em espectrofotômetro Elisa a 600 nm. Esta substância é reduzida a formazana, de coloração roxa, na presença de microrganismos viáveis (CEDILLO-RIVERA et al., 1991).

Na literatura, também há relatos de métodos nos quais a substância a ser testada é incorporada ao meio de cultura nas concentrações a serem pesquisadas. Os microrganismos, no caso fungos, são inoculados no meio solidificado no centro de cada placa de Petri em discos de material micelial de 0,5 cm (culturas de sete dias) e são feitos controles negativos contendo somente a substância teste e o meio sem presença de microrganismo. As placas são incubadas à temperatura de 22 ± 1 °C por sete dias. A efetividade é avaliada pela medida do diâmetro de crescimento das colônias. A percentagem de inibição é calculada pela equação: $I = 100 (C - T) C^{-1}$, sendo I = inibição, C = medida do diâmetro de crescimento do fungo no meio controle e T = medida do diâmetro de crescimento do fungo no meio contendo a substância (RICCI et al., 2005; TUBEROSO et al., 2005).

Outro método descrito para avaliação da atividade antifúngica é a determinação da concentração fungicida mínima (MFC) (RICCI et al., 2005) e diluição em caldo RPMI-1640 em placas de microtítulo para determinação do MIC (NCCLS, 2002).

Na determinação da MFC a técnica utilizada é da filtração de membrana. O inóculo é adicionado à substância, e essa mistura é mantida a temperatura ambiente por um determinado tempo de contato. Após o tempo de contato, a mistura é transferida para um aparelho de filtração estéril sendo lavado por duas vezes com solução neutralizante (água destilada com tween estéril). As membranas são transferidas para placas contendo ágar e após a incubação as colônias são contadas na membrana. A MFC corresponde a

menor concentração da substância a qual inibe a multiplicação de fungos (RICCI et al., 2005).

3 FUNGOS FILAMENTOSOS

Os fungos filamentosos são microrganismos eucariotas constituídos por um emaranhado de hifas que em conjunto constitui os micélios e estruturas de reprodução (esporos). São importantes como patógenos de plantas, animais e humanos.

3.1 INFORMAÇÕES SOBRE ALGUNS FUNGOS FILAMENTOSOS

- *Alternaria brassicicola*: fungo filamentoso cujos hospedeiros são as crucíferas (PATOLOGIA..., 2006).
- *Aspergillus flavipes*: fungo filamentoso isolado de laticínios (Minnesota, USA) de acordo com informação fornecida pela FIOCRUZ.
- *Aspergillus niger*: saprófitas cosmopolitas que causam problemas na degradação de órgãos vegetais armazenados. Em sementes é prejudicial quando lotes são armazenados com umidade elevada. Muitas espécies do gênero *Aspergillus* são capazes de produzir micotoxinas (DOCTOR ..., 2006).
- *Cladosporium sphaerospermum*: espécie cosmopolita, e invasores secundários de diferentes plantas. Pode ser isolado do ar, solo, alimentos estocados, têxteis e ocasionalmente do homem e animais (DOCTOR..., 2006).
- *Fusarium oxysporum*: patógeno vascular causando amarelecimento e queda de folhas. Transmitido aderido às sementes sobrevivendo no solo e em restos de cultura. Tem como hospedeiros o feijão e algodão (DOCTOR..., 2006).

MATERIAL E MÉTODOS

1 MATERIAL

1.1 AMOSTRAS

Amostras de cúrcuma em pó da safra de 2006 foram gentilmente fornecidas pela Agroindustrial Ouro Vermelho, localizada em Nova Esperança (PR). As amostras foram homogeneizadas e divididas em diferentes lotes, os quais foram utilizados para a extração dos óleos essenciais.

1.2 MICRORGANISMOS TESTES

As culturas de fungos utilizadas foram gentilmente cedidas pela FIOCRUZ (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) sendo todas da *American Type Culture Collection* - ATCC (tabela 4). A escolha destes fungos foi devida à possibilidade destes em causarem deterioração em vegetais e grãos assim como possíveis produtores de micotoxinas.

TABELA 4: Fungos filamentosos padrões da ATCC utilizados no estudo

Microrganismos testes	ATCC
<i>Alternaria brassicicola</i> (<i>At. brassicicola</i>)	6650
<i>Aspergillus flavipes</i> (<i>A. flavipes</i>)	16814
<i>Aspergillus niger</i> (<i>A. niger</i>)	16404
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> (<i>C. sphaerospermum</i>)	1740
<i>Fusarium oxysporum</i> (<i>F. oxysporum</i>)	48112

ATCC - *American Type Culture Collection*.

1.3 REAGENTES E PADRÃO DE ANTIBIÓTICO

Foram utilizados reagentes de grau analítico, exceto o solvente para a espectrofotometria com leitura em absorbância em luz ultravioleta (UV) que foi de grau cromatográfico. Utilizou-se como meio de cultivo o ágar Sabouraud (Difco, Sparks, MD, EUA), discos de papel estéreis de 6 mm (CECON, São Paulo, Brasil), e placas de Petri descartáveis (100 x 20 mm). O padrão de curcumina foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha).

O antibiótico utilizado como controle positivo foi a anfotericina B (Fungizon® Squibb, São Paulo, Brasil). Foram feitas, para cada experimento, soluções estoque contendo 2 mg/mL do antibiótico. Desta solução, foram pipetados 5, 10 e 20 μ L, correspondendo às concentrações de 10, 20 e 40 μ g de antibiótico por disco.

2 MÉTODOS

Os trabalhos foram conduzidos nos Laboratórios de Bioquímica de Alimentos, de Controle de Qualidade Biológico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, MG) e também no Laboratório de Química da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, MG).

2.1 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais da cúrcuma foram extraídos pelo método de hidrodestilação e por extração com hexano de acordo com método empregado pela AOAC (1995) e por SINGH et al. (2002b), respectivamente.

Hidrodestilação

Para a extração por hidrodestilação foi utilizado o aparelho de Clevenger acoplado a balão de 2000 mL. A cúrcuma em pó (60 g) e 1000 mL de água foram colocados no balão e levado para manta aquecedora. A extração foi feita durante 6 h contadas a partir da ebulição da amostra. O óleo essencial foi coletado do condensador (AOAC, 1995). Todo o sistema foi protegido da luz por meio de papel alumínio e o óleo essencial foi armazenado em frascos âmbar sob congelamento.

Extração com hexano

Para a extração com solvente, a cúrcuma em pó (60 g) foi adicionada de 500 mL de hexano. Esta mistura foi mantida à temperatura ambiente por 12 h sob agitação com magneto e a mistura foi filtrada em funil de Buchner utilizando papel de filtro. O solvente foi eliminado em evaporador rotatório (Büchii, Suíça) a 60 °C (SINGH et al., 2002b). Em todas as etapas, as amostras foram protegidas da luz e o óleo essencial foi armazenado em frascos âmbar sob congelamento.

2.2 DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Para caracterização físico-química das amostras de óleos essenciais foram realizadas as seguintes análises: rendimento na extração dos óleos essenciais, peso específico, índice de refração, valor éster, teores de pigmentos curcuminóides e perfil cromatográfico das amostras de óleo.

2.2.1 Rendimento

O rendimento foi determinado em três amostras pela relação massa/massa e em oito amostras pela relação volume/massa. As massas dos óleos essenciais foram determinadas em balança analítica e seus valores comparados às respectivas massas da cúrcuma em pó utilizada e os volumes foram determinados pela leitura no aparelho de Clevenger (TALLON-NETTO, 2004).

2.2.2 Determinação do peso específico

O cálculo do peso específico dos óleos essenciais foi feito aplicando-se a fórmula $d = m/v$, fixando-se um volume constante de óleo essencial (1 mL) e determinando-se a massa. A razão entre a massa do óleo e o volume constante da amostra, em g/mL foi determinada em balança analítica seguindo a metodologia descrita no IAL (1985) a temperatura de 25 °C.

2.2.3 Índice de refração

A determinação do índice de refração foi feita diretamente em refratômetro de Abbé (modelo RL1-PZO, Warszawa, Polônia) de acordo com a metodologia descrita pela AOAC (1995). Com um capilar foram colocadas duas gotas do óleo no refratômetro equipado com termômetro. Com o refratômetro ajustado às condições experimentais, e temperaturas do óleo e ambiente de 25 °C, foram fechados os prismas que compõem o instrumento e realizada a leitura pela escala do aparelho.

2.2.4 Valor éster

Cerca de 2 g de óleo foram pesadas em um erlenmeyer, adicionado de cerca de 5 mL de álcool etílico sob agitação e duas gotas de solução alcoólica de fenolftaleína 1%. A mistura foi titulada com solução 0,1 N de hidróxido de sódio até mudança de cor da solução de incolor para rósea. À solução resultante da titulação foi adicionada de 20 mL de hidróxido de potássio 4% utilizando uma bureta.

O erlenmeyer foi adaptado a um condensador de refluxo e aquecido até ebulição em banho-maria por 30 minutos. Após resfriamento, foram adicionadas duas gotas de solução alcoólica de fenolftaleína 1% e titulada com uma solução 0,5 N de ácido clorídrico (HCl) até mudança de cor da solução de rósea para incolor.

Foi realizada também uma titulação de branco, no qual estavam presentes todos os reagentes com exceção da amostra de óleo.

A diferença entre os dois volumes de solução de HCl está relacionada com a quantidade de hidróxido de potássio gasta na saponificação dos ésteres presentes no óleo (VASCONCELOS & GODINHO, 2002). O índice de éster foi calculado pela equação:

$$IE = VN56,1/m,$$

sendo

V = a diferença entre os volumes de solução de HCl gastos na titulação da amostra e do branco em mililitros,

N = normalidade da solução de HCl, e

m = massa de amostra de óleo em grama.

2.2.5 Pigmentos curcuminóides

Os teores de pigmentos curcuminóides das amostras de óleos essenciais foram determinados por espectrofotômetro UV com leitura em absorbância a 425 nm de acordo com o método de TAKAHASHI (1987).

Foram pesadas inicialmente 0,05 g das amostras de óleo essencial em balança analítica diretamente em balões volumétricos âmbar de 25 e 50 mL para os óleos obtidos por hidrodestilação e hexano, respectivamente. As amostras foram diluídas em etanol grau cromatográfico. Estas soluções foram diluídas e homogeneizadas de forma a se obter concentrações de 0,57 mg/mL e 0,002 mg/mL dos óleos obtidos por hidrodestilação e hexano, respectivamente. Em seguida, as amostras foram novamente diluídas de forma que as leituras pudessem ser interpoladas a curva-padrão.

Foi construída a curva padrão utilizando-se o padrão de curcumina (Merck, Darmstadt, Alemanha) com pureza de 98%. A solução padrão estoque foi preparada pesando-se 0,0077 g para balão volumétrico de 50 mL (0,154 mg/mL). Em seguida foram feitas cinco diluições da solução padrão estoque (2,5 a 8,75 mL) em balões de 25 mL o que correspondem as concentrações de: 0,015; 0,030; 0,038; 0,045 e 0,053 mg/mL. Essas soluções foram lidas em espectrofotômetro.UV-VIS (Shimadzu, Kyoto, Japão) em absorbância a 425 nm, em triplicata.

Para o cálculo das concentrações (mg/mL) os valores encontrados para as leituras, foram comparados à curva padrão. O resultado foi expresso em mg de óleo essencial por 100g de amostra.

2.2.6 Perfil cromatográfico dos óleos essenciais

O perfil cromatográfico das amostras foi determinado por cromatografia gasosa (CG), utilizando-se a metodologia descrita por BARBOSA et al. (2006). A análise do óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas (GG-EM), utilizando-se equipamento da marca Shimadzu, modelo CGMS-QP 5050A. Para a identificação dos constituintes químicos foi empregada uma coluna DB-5HT, da marca J & W Scientific, com 30 m de comprimento, diâmetro de 0,32 mm, espessura do filme de 0,10 μm , e nitrogênio como gás carreador. As condições de operação do cromatógrafo a gás foram: pressão interna da coluna de 56,7 kPa, razão de split de 1:20, fluxo de gás na coluna de 1,0 mL/min (210 °C), temperatura no injetor de 220 °C, temperatura no detector ou na interface (CG-EM) de 240 °C. A temperatura inicial da coluna foi de 60 °C, seguido de um incremento de 3 °C/min até atingir 240 °C, sendo mantida constante por 30 min. O espectrômetro de massas foi programado para realizar leituras em uma faixa de 29 a 400 Da, em intervalos de 0,5 s, com energia de ionização de 70 eV.

Foram injetados no CG 1 μL de cada amostra na concentração de 10.000 ppm dissolvida em hexano. A identificação dos componentes foi feita pela comparação de seus espectros de massas com os disponíveis no banco de dados da espectroteca Willey 330.000 e também pelos índices de Kovats (IK). Para o cálculo dos índices de Kovats, foi injetada no cromatógrafo uma mistura de alcanos lineares (C10 a C24).

A quantificação dos componentes foi realizada utilizando-se um cromatógrafo a gás com detector de ionização de chamas (CG-IC) da marca Shimadzu, modelo CG-17A. As

análises foram realizadas nas mesmas condições descritas para a identificação dos constituintes. Essas análises foram realizadas em triplicata.

2.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DA CÚRCUMA

Os testes foram conduzidos utilizando o método do disco difusão proposto pelo NCCLS (2000).

Padronização do inóculo

Os fungos teste foram cultivados em placas de Petri contendo ágar Sabouraud a 25 ± 1 °C (estufa BOD, TECNAL, TE-391) por 72 h. Para todos os fungos, a exceção do *A. niger*, a cultura foi lavada com cerca de 3 mL de salina (0,9% p/v) adicionada de tween 80 (0,1% v/v) e pérolas de vidro.

Após a adição de salina foi feita uma leve raspagem com alça de níquel-cromo, de forma a remover apenas os esporos dos fungos evitando assim, a transferência de fragmentos de ágar e de hifas. A suspensão fúngica (3 mL) foi coletada com ponteiros estéreis acopladas a micropipeta automática (1000 µL) e transferida para os tubos contendo 7 mL de salina. Estes tubos foram agitados em aparelho tipo vórtex (Phoenix AP56) por 1 minuto.

Quanto ao *A. niger*, a suspensão padrão foi conseguida pela transferência direta dos esporos por meio de alça de níquel-cromo para a solução salina adicionada de tween 80.

A turbidez das suspensões padrão dos fungos foram padronizadas em espectrofotômetro (Coleman, Modelo 6120, Maywood, IL, EUA) a $50 \pm 1\%$ de transmitância (NCCLS, 2000) em comprimento de onda de 580 nm utilizando como branco salina estéril 0,9% com tween 80 (0,1%) e pérolas de vidro.

A partir das suspensões padrão foram feitas diluições de 10^{-2} para *At. brassicicola*, e 10^{-3} para *A. niger*, *A. flavipes*, *C. sphaerospermum* e *F. oxysporum* e dessas retirou-se 1000 µL com pipeta automática que foram semeadas pelo método de *pour-plate* (SHADOMY & ESPINEL-INGROFF, 2000).

Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais

Os óleos essenciais obtidos por hidrodestilação e por extração com hexano foram usados sem diluição. Um volume de 20 µL de cada extrato foi usado para impregnar individualmente, discos de papel estéreis de 6 mm, que foram colocados na superfície do ágar previamente inoculado. Os discos de papel foram impregnados com os óleos essenciais no dia do experimento e deixados secar a temperatura ambiente.

Teste de difusão em discos de papel

Foram utilizadas placas de Petri de 100 x 20 mm de diâmetro, nas quais foram colocadas 1000 µL do inóculo diluído e 20 mL de ágar Sabouraud fundido e resfriado a 48 °C (FARMACOPÉIA..., 1988). As placas foram homogeneizadas e deixadas em repouso até a solidificação do ágar. Os discos foram impregnados com 20 µL dos óleos essenciais e com o controle positivo (anfotericina B). As concentrações destes antibióticos variaram de 10 a 40 µg/mL, dependendo do microrganismo (tabela 5).

Foram adicionados às placas também discos impregnados com 20 µL dos solventes (água e hexano) utilizados na extração dos óleos essenciais.

TABELA 5: Concentração do antibiótico anfotericina B impregnado nos discos de papel para as cepas de fungos filamentosos

Microrganismos testes	ATCC	Anfotericina B (µg/mL)
<i>At. brassicicola</i>	6680	10
<i>A. flavipes</i>	16814	40
<i>A. niger</i>	16404	20
<i>C. sphaerospermum</i>	1740	40
<i>F. oxysporum</i>	48112	40

Os discos contendo o antibiótico e os solventes foram colocados em estufa a 36 °C por 24 h, antes de sua aplicação sobre o meio. Após sua aplicação, os discos foram colocados em contato com o ágar inoculado e deixados por um período de 1 h à temperatura de 4 °C para melhor difusão das substâncias em análise (SKOCIBUSIC et al., 2006). Em seguida, as placas foram incubadas em posição invertida por 72 h e temperatura de 25 ± 1 °C.

Os diâmetros dos halos de inibição foram medidos com paquímetro considerando-se o diâmetro total do disco (em mm). Todos os experimentos foram realizados em três repetições e as análises foram efetuadas em triplicata.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação das médias ($p \leq 0,05$) (PIMENTEL-GOMES, 1990).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais obtidos pelos métodos de extração por hidrodestilação e por hexano apresentaram um mesmo odor forte e pungente característico, mas diferenciaram-se pela coloração: aqueles obtidos por hidrodestilação apresentaram uma coloração amarela clara e os obtidos com hexano apresentaram uma coloração amarela mais intensa.

Os rendimentos dos processos de extração estão apresentados na tabela 6. Estes estão de acordo com valores descritos na literatura, dentre eles, 2,5 a 7,0 % (KRISHNAMURTHY et al., 1976; VIASAN et al., 1989; LEUNG & FOSTER, 1996), 4,5 a 5,8 % (GOVINDARAJAN, 1980), 3,07 % (SOUZA & GLÓRIA, 1998), 3,65 % (TALLONNETTO, 2004) e 4,4 % (PÉRET-ALMEIDA, 2006).

Observa-se que o rendimento foi maior na extração com hexano (4,81 g/100 g), comparado ao obtido por hidrodestilação (2,58 g/100 g). Um maior rendimento na extração por hexano comparado a hidrodestilação também foi observado por SOUZA & GLÓRIA (1998).

TABELA 6: Rendimento dos óleos essenciais obtidos do rizoma da *Curcuma longa* L em pó por hidrodestilação e por extração com hexano

Repetições	Rendimento (g/100 g) / método de extração	
	Hidrodestilação	Hexano
1	2,64	4,90
2	2,34	4,82
3	2,75	4,70
Média	2,58 ^a	4,81 ^b
Desvio padrão	0,21	0,10
Coefficiente de variação	8,18	2,13

Valores médios com letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA, $p \leq 0,05$).

Ao avaliar os rendimentos em volume do óleo essencial por massa de cúrcuma em pó obtidos pelos dois métodos de extração (tabela 7), os resultados são confirmados, ou seja, maior rendimento na extração com hexano em relação ao obtido por hidrodestilação. A extração por hexano, além de fornecer um maior rendimento, foi mais simples e rápida.

TABELA 7: Rendimento dos óleos essenciais obtidos da cúrcuma em pó por hidrodestilação e por extração com hexano

Réplicas	Volume (mL/ 100 g) / método de extração	
	Hidrodestilação	Hexano
1	3,5	3,0
2	3,0	4,0
3	2,5	3,0
4	3,0	5,0
5	2,5	5,0
5	2,5	5,0
7	2,5	5,0
8	3,0	5,0
Média	2,8 ^a	4,4 ^b
Desvio padrão	0,37	0,92

Valores médios com letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA, $p \leq 0,05$).

2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os resultados obtidos durante a caracterização dos óleos essenciais da cúrcuma em pó estão apresentados na tabela 8.

TABELA 8: Características físico-químicas dos óleos essenciais da *Curcuma longa* L. obtidos pelos métodos de extração por hidrodestilação e por hexano

Características	Valores / método de extração	
	Hidrodestilação	Hexano
Peso específico (g/mL) a 25 °C	0,906 ± 0,0003 ^a	0,917 ± 0,0003 ^b
Índice de refração a 25 °C	1,5069 ± 0,0001 ^a	1,5186 ± 0,0002 ^b
Valor éster (mg de KOH/g)	2,9 ± 0,3 ^a	4,1 ± 0,1 ^b
Teor de pigmentos (mg/100 g)	335,84 ^a	647,62 ^b

Valores médios com letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA, $p \leq 0,05$).

2.1 PESO ESPECÍFICO

Os resultados do peso específico em g/mL a 25 °C dos óleos essenciais obtidos pelos dois métodos de extração estão resumidos na tabela 8, com os respectivos desvios padrão.

Ao comparar os valores obtidos os óleos essenciais em relação à água destilada, cujo peso específico é de 1 g/mL a 20 °C, nota-se que os óleos essenciais são menos densos. Durante a hidrodestilação, esta característica já havia sido notada uma vez que se verificou uma nítida separação de fases, ficando o óleo na parte superior do tubo coletor.

Ao comparar os resultados entre os métodos de extração dos óleos essenciais, verificou-se um maior peso específico dos óleos obtidos com hexano. Os valores encontrados estão de acordo com valores descritos na literatura, levando-se em consideração as temperaturas de análise: 0,929 a 20 °C, 0,9423 a 24 °C para a cúrcuma indiana (KRISHNAMURTHY et al., 1976; GOVIDARAJAN, 1980) e 0,9068 g/mL a 30 °C para a cúrcuma brasileira (PÉRET-ALMEIDA, 2006). Entretanto não foram encontrados dados comparando os métodos de extração com relação a este parâmetro.

2.2 ÍNDICE DE REFRAÇÃO

Os índices de refração dos óleos essenciais obtidos pelos diferentes métodos estão apresentados na tabela 8. Estes resultados são similares aos valores descritos na literatura, ou seja, 1,5054 a 30 °C (GOVINDARAJAN, 1980), 1,5130 a 24 °C (KRISHNAMURTHY et al., 1976) e 1,5067 a 30 °C (PÉRET-ALMEIDA, 2006).

Por se tratar de uma constante, este índice torna-se útil não só para identificar a substância, mas também para detectar a presença de impurezas (IAL, 1985). Isto pode ser relevante ao comparar os resultados dos extratos obtidos por diferentes métodos. Os maiores valores encontrados nos óleos obtidos com hexano podem indicar que este solvente foi capaz de extrair mais substâncias (impurezas) quando comparado à hidrodestilação. De fato, o hexano extrai mais pigmentos curcuminóides comparado à hidrodestilação (tabela 8).

2.3 VALOR ÉSTER

Os resultados do valor éster dos óleos essenciais encontram-se na tabela 8. Os resultados encontrados foram próximos àqueles da literatura, os quais variaram de 3,2 a 6,45 mg KOH/g (GOVINDARAJAN, 1980).

Foi observada diferença significativa no valor éster dos diferentes extratos. Uma vez que estes valores estão relacionados ao grau de saponificação das amostras, o óleo obtido por hexano seria mais rico em ésteres comparado a hidrodestilação (VASCONCELOS & GODINHO, 2002).

2.4 TEORES DE PIGMENTOS CURCUMINÓIDES

Como o padrão de curcumina da Merck (Darmstadt, Alemanha) consiste, na realidade, da mistura de três pigmentos curcuminóides (PÉRET-ALMEIDA et al., 2005), a proporção dos pigmentos (bisdesmetoxicurcumina = 13,0%, desmetoxicurcumina = 30,1% e curcumina = 56,9%) foi levada em consideração. A curva-padrão construída com os parâmetros absorvância em UV e concentração (mg/mL) apresentou linearidade, e boa correlação com coeficiente de determinação (R^2) de 0,965 (figura 3).

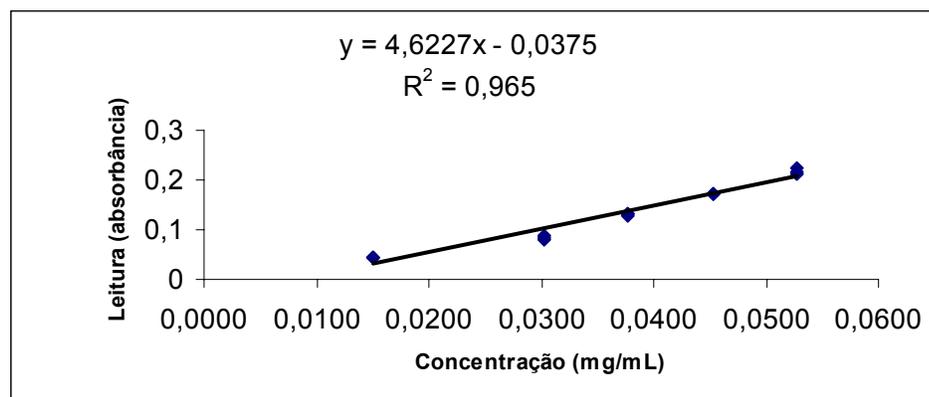


Figura 3: Curva padrão (concentração x absorvância) para pigmentos curcuminóides.

Observou-se uma diferença significativa de acordo com a tabela 8 nos teores pigmentos curcuminóides: 335,84 mg/100 g e 647,42 mg/100 g, respectivamente, nos extratos hidrodestilado e hexânico. Maiores teores de pigmentos foram observados na pela extração com hexano. Estes resultados são coerentes com a coloração apresentada pelos óleos e ainda aos resultados descritos por SOUZA & GLÓRIA (1998).

De acordo com esses resultados, observa-se que os óleos essenciais apresentaram características físico-químicas distintas. De acordo com a literatura, as diferenças nas características físico-químicas de óleos essenciais podem estar associadas a fatores como a planta matriz, tipo de solo, adubação, disponibilidade de água, época de colheita, tempo de armazenamento, dentre outros (OLIVEIRA et al., 1992; SCARTEZZINI & SPERONI, 2000). Entretanto, como as amostras utilizadas neste estudo eram de uma mesma procedência e lote, as diferenças observadas estariam diretamente relacionadas ao método de extração dos óleos essenciais. Dentre estes fatores, pode-se destacar as condições de temperatura e os solventes utilizados no arraste dos óleos.

2.5 PERFIL DOS ÓLEOS ESSENCIAIS POR CG-IC E CG-EM

Ao todo, foram detectadas 26 substâncias voláteis nos extratos obtidos com hexano e por hidrodestilação (tabela 9). No extrato por hidrodestilação foram detectadas 22 destas substâncias, enquanto que no extrato por hexano, foram detectadas 16 substâncias. As substâncias presentes no óleo essencial da cúrcuma apresentaram tempos de retenção maiores do que do alcano C14 até o C18. Interessante observar que ambos os extratos continham, predominantemente, compostos com C16, seguido de C17 e C15 (figura 4). Nos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação e extração hexânica houve predominância de C16. Porém o extrato hexânico apresentou menores percentuais de C15 e C17, ao obtido por hidrodestilação.

Dentre estas substâncias, foi possível identificar oito compostos em função dos respectivos índices de Kovats (IK) e na fragmentação por espectrometria de massas. Os espectros obtidos para as substâncias predominantes estão apresentados na figura 5 e as estruturas das substâncias na figura 6. Todas as substâncias identificadas já haviam sido encontradas em rizomas e folhas de cúrcuma (VIASAN et al., 1989; MATA et al., 2004).

Comparando o percentual de cada composto identificado nos extratos (tabela 10), a ordem de prevalência das substâncias foi semelhante, sendo a ar-turmerona a predominante, seguida pela α -turmerona, com percentuais superiores a 50 e 25% respectivamente. Dentre as substâncias presentes em percentual inferior a 5%, o β -sesquifelandreno foi o predominante, seguido do ar-curcumeno, do α -zingibereno e do β -bisaboleno.

Os resultados obtidos indicam que os métodos de extração de óleos essenciais utilizados neste trabalho foram capazes de extrair os componentes voláteis α -zingibereno, ar-curcumeno, β -sesquifelandreno e ar-turmerona. Tais resultados estão de acordo com a literatura. KELKAR & RAO (1934); RICHARD & LOO (1992) e MATA (1999) também relataram a presença destes compostos voláteis no óleo essencial de cúrcuma. Os resultados também estão de acordo com OGUNTMEIN et al. (1990), os quais relataram que os principais constituintes dos óleos essenciais do rizoma são os sesquiterpênicos cetônicos turmerona e α -turmerona.

TABELA 9: Características das substâncias voláteis detectadas no CG nas amostras de óleo essencial de cúrcuma obtidas por hidrodestilação e por extração com hexano

Sinal	Retenção (min)	Número carbono	Índice Kovats		Composto	Área relativa (%)	
			obtido	teórico		hidrodes- tilação	hexano
1	31,226	14	1411,8	1418	Trans-cariofileno	0,18	-
2	32,385	14	1439,8		NI	0,71	0,68
3	34,062	14	1478,7	1483	Ar-curcumeno	2,62	1,69
4	34,624	15	1489,7	1495	α -zingibereno	1,26	2,51
5	35,16	15	1503,7	1509	β -bisaboleno	0,5	1,08
6	35,792	15	1519,9	1524	β -sesquifelandreno	3,87	3,25
7	35,997	15	1525,1		NI	0,66	-
8	36,918	15	1548,2		NI	0,59	0,91
9	37,238	15	1556,0		NI	0,3	-
10	37,575	15	1564,3		NI	0,07	-
11	37,983	15	1574,1		NI	0,48	-
12	38,175	15	1578,7		NI	0,26	-
13	38,558	15	1587,8		NI	0,47	-
14	39,028	15	1598,9		NI	1,52	0,82
15	39,225	16	1604,0		NI	0,51	-
16	40,335	16	1633,8		NI	1,3	0,83
17	41,177	16	1655,8		NI	-	1,7
18	41,827	16	1672,5	1664	Ar-turmerona	42,08	50,2
19	42,944	17	1700,6		α -turmerona	30,2	21,2
20	44,466	17	1742,0		5-dimetil-4hexenil-3- metil	-	0,74
21	44,542	17	1745,1		NI	0,71	-
22	44,828	17	1752,8		NI	0,43	1,41
23	45,142	17	1761,3		NI	0,21	-
24	45,282	17	1765,1		NI	-	0,84
25	45,56	17	1772,5		NI	1,15	2,66
26	46,838	18	1807,0		NI	-	1,1
Total						90,08	91,62

Ni = não identificado; - = não encontrado

Os principais componentes ar-turmerona e α -turmerona juntos perfazem 72,28% no extrato obtido por hidrodestilação e 71,40% no obtido com hexano. A ar-turmerona foi

melhor extraída com hexano e, em contrapartida, a α -turmerona foi melhor extraída com hidrodestilação. Provavelmente, a maior capacidade de arraste da α -turmerona pelo hexano, foi devida a maior afinidade desta substância pelo solvente por conter na sua estrutura um anel aromático, o que não ocorre com a α -turmerona.

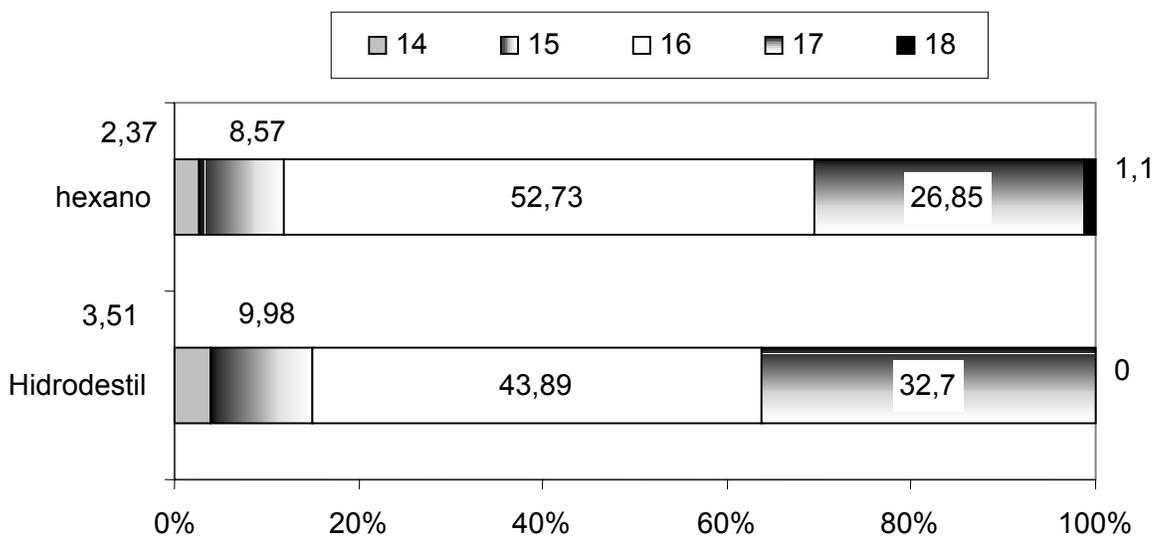


Figura 4: Perfil do processo de extração por hidrodestilação ou hexano no percentual de substâncias voláteis da cúrcuma com 14 a 18 carbonos.

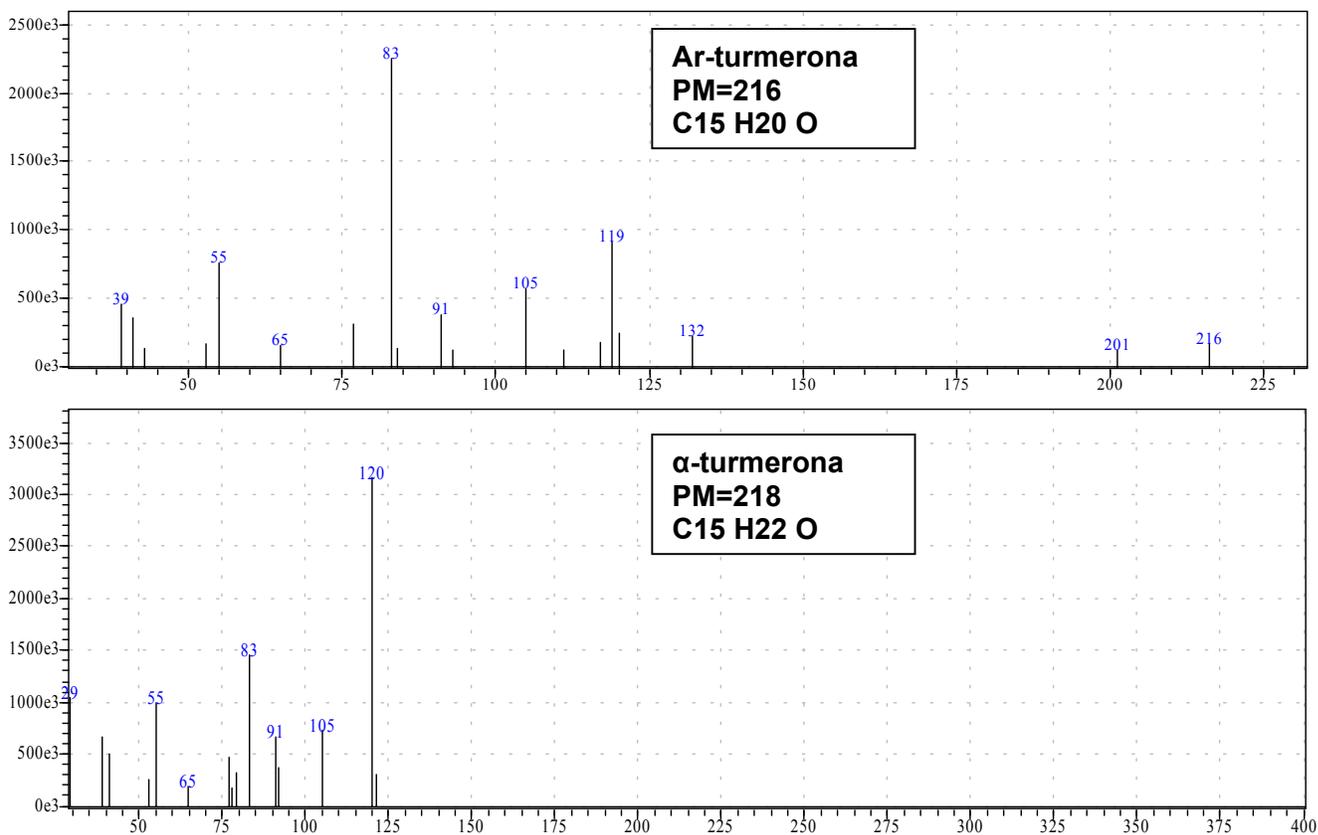


Figura 5: Espectros de massa da ar-turmerona e α -turmerona presentes no óleo essencial da cúrcuma.



Figura 6: Estruturas das substâncias voláteis ar-turmerona (A) e α -turmerona (B).

TABELA 10: Percentual de substâncias voláteis identificadas por CG nas amostras de óleos essenciais de cúrcuma obtidas por hidrodestilação e por extração com hexano

Sinal	Retenção (min)	Número carbonos	Composto	Percentual da área (%)	
				Hidrodestilação	Hexano
1	31,226	14	Trans-cariofileno	0,22	0,00
3	34,062	14	Ar-curcumeno	3,25	2,09
4	34,624	15	α -zingibereno	1,56	3,11
5	35,16	15	β -bisaboleno	0,62	1,34
6	35,792	15	β -sesquifelandreno	4,79	4,03
18	41,827	16	Ar-turmerona	52,14	62,23
19	42,944	17	α -tumerona	37,42	26,28
20	44,466	17	5-dimetil-4hexenil-3-metil	0,00	0,92
Total				80,71	80,67

3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DA CÚRCUMA FRENTE A FUNGOS FITOPATÓGENOS

O método de disco difusão foi utilizado por permitir obter resultados seguros (halos) sem a interferência da cor do extrato e solventes utilizados na extração. É um dos métodos mais citados e utilizados na literatura na avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais (RIOS et al., 1988).

Na tabela 11 estão apresentados os resultados nos testes de atividade antifúngica *in vitro* do extrato de óleos essenciais da cúrcuma, obtidos por hidrodestilação e com hexano contra fungos fitopatógenos.

O óleo essencial obtido por hidrodestilação apresentou atividade antifúngica *in vitro* contra *At. brassicicola* e *A. flavipes*. Quando testado com o *A. niger*, o óleo essencial hidrodestilado apresentou uma atividade incipiente com inibição apenas local (correspondente ao diâmetro do disco). Resultados semelhantes foram obtidos com o óleo extraído com hexano. Sendo o diâmetro dos halos de inibição resultantes de sua ação sobre *At. brassicicola* e *A. flavipes* ligeiramente maiores.

Os fungos *C. sphaerospermum* e *F. oxysporum* não apresentaram sensibilidade a nenhum dos óleos essenciais.

Os halos obtidos com anfotericina B foram observados contra todos os fungos investigados. A anfotericina B, por se tratar de um antibiótico clássico serve para mostrar a funcionalidade do método.

TABELA 11: Halos de inibição obtidos para os óleos essenciais da cúrcuma extraídos por hidrodestilação e com hexano e para anfotericina B contra fungos fitopatógenos

Fungos teste ATCC	Halos inibição ± DP (mm)		
	Óleo essencial hidrodestilação (n=3)	Óleo essencial hexânica (n=3)	Anfotericina B (n=6)
<i>At. Brassicicola</i> /6650	9,34 ± 0,05 ^a	10,39 ± 0,005 ^b	22,97 ± 1,05
<i>A. flavipes</i> /16814	9,69 ± 0,05 ^a	10,89 ± 0,26 ^b	16,07 ± 0,12
<i>A. niger</i> /16404	6,00(*)	6,00(*)	16,00 ± 0,00
<i>C. sphaerospermum</i> /1740	ND	ND	9,74 ± 0,33
<i>F. oxysporum</i> /48112	ND	ND	9,40 ± 0,04

(*) A inibição ocorreu somente no ponto de aplicação; ND= Não detectável. Valores médios com letras diferentes indicam diferença significativas (Tukey, $p \leq 0,05$).

Pela análise estatística (ANOVA), foi verificado que quando foram comparados os halos de inibição obtidos para *At brassicicola* e *A. flavipes*, não houve diferença significativa com o mesmo extrato. Apesar do extrato hexânico ter acarretado halos de inibição ligeiramente maiores.

A atividade antifúngica diferiu significativamente (teste de Tukey para 5% de probabilidade) entre os extratos para os fungos *A. flavipes* e *At. brassicicola* e também entre os extratos sendo que o extrato hexânico produziu halos de inibição maiores para os

dois microrganismos. Tendo em vista que foram observadas variações estatisticamente significativas nas características físico-químicas pesquisadas, pode-se deduzir que essas variações influenciaram a atividade antifúngica.

O método de difusão em ágar por *pour-plate* mesmo não sendo o mais utilizado para pesquisa com fungos produziu resultados satisfatórios comprovados pela atividade verificada para a anfotericina B, controle positivo, o que demonstrou a funcionalidade do método e a validade dos resultados.

Os microrganismos apresentaram crescimento algodinoso ou pulverulento formado por um emaranhado de hifas constituindo os micélios fúngicos de colorações variadas (figura 7).

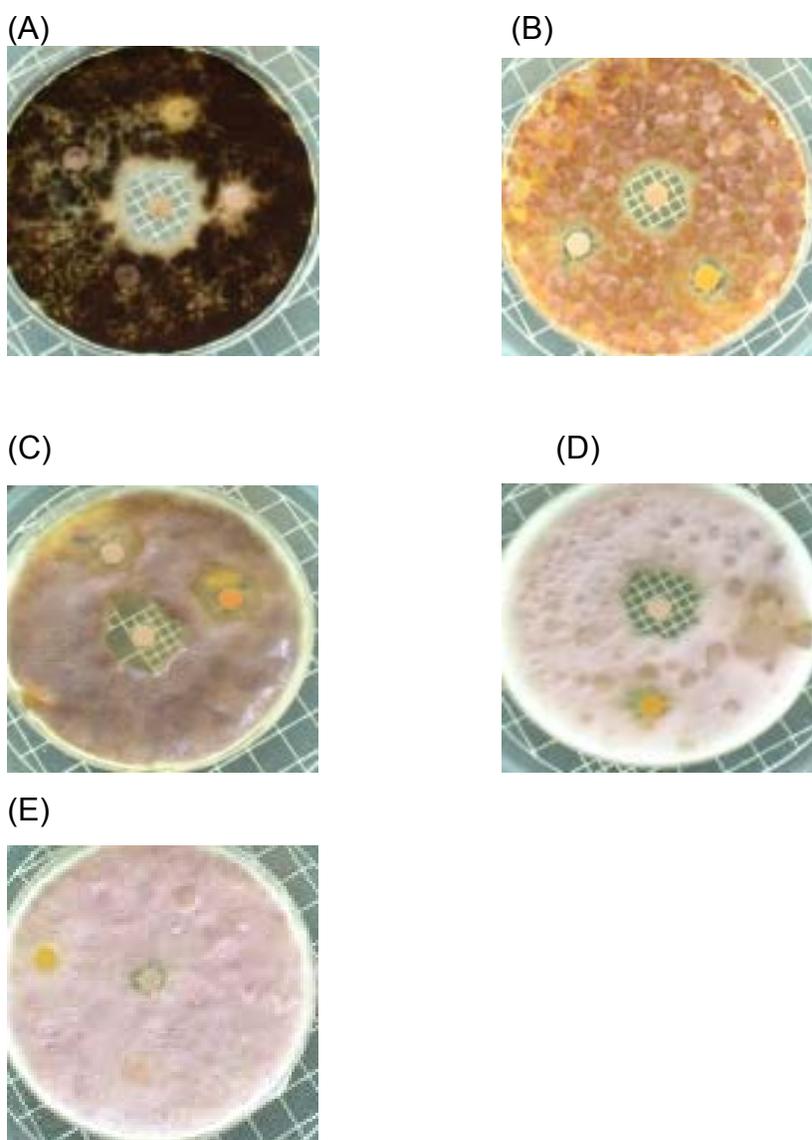


Figura 7: Crescimento dos fungos filamentosos e halos de inibição do crescimento por óleo essencial de cúrcuma: (A) *A. niger*, (B) *A. flavipes*, (C) *At. brassicicola*, (D) *F. oxysporum* e (E) *C. sphaerospermum*.

A atividade antifúngica observada pode ser devida a substâncias voláteis dos óleos essenciais como, por exemplo, a ar-turmerona presente em percentuais significativos nos extratos. De fato, LEE et al. (2003) observaram atividade antifúngica da ar-turmerona isolada da fração hexânica quando testada na concentração de 500 µg/mL contra os fungos *E. graminis* e *P. infestans*.

Como os óleos essenciais são misturas complexas de várias substâncias, a atividade antifúngica observada não pode ser atribuída a uma substância isolada, mas ao conjunto delas. De acordo com HOLLEY & PATEL (2005), a composição química bem como os grupos funcionais dos óleos têm um papel importante na atividade antimicrobiana e essa atividade pode ser potencializada.

CONCLUSÕES

- A extração com hexano foi mais simples e rápida e apresentou um rendimento maior quando comparada a hidrodestilação.
- Os óleos essenciais obtidos por extração hexânica apresentaram valores significativamente maiores para o peso específico, índice de refração, valor éster e teores de pigmentos curcuminóides.
- Foram detectadas 26 substâncias voláteis por CG-EM sendo 22 no extrato hidrodestilado e 16 no hexânico. Oito substâncias foram identificadas sendo estas da classe dos terpenos. Turmerona (α e β) foi o composto predominante.
- A atividade antifúngica foi evidenciada contra *At. brassicicola* e *A. flavipes* para ambos os extratos. Sendo que o extrato hexânico produziu halos de inibição maiores para os dois microrganismos.
- O método de extração do óleo essencial afetou de forma significativa a atividade antifúngica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEA (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ENGENHEIROS DE ALIMENTOS). Seção regional do estado de São Paulo. Aplicação tecnológica de aditivos e nutrientes em alimentos. São Paulo: ABEA, 1984. 111p.
- AÇAFRÃO: as marcas na trilha do ouro. *Globo Rural*, v.72, p. 20-21, 1991.
- AGÊNCIA SEBRAE NOTÍCIAS. Disponível em: <<http://www.interjornal.com.br>>. Acesso em: 20 set. 2006.
- AMARAL, C.E.C. Quantificação por CLAE e características de cor CIE L* a* b* de pigmentos curcuminóides. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2000. 71p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- AMMON, H.P.T.; WAHL, M.A. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Medica*, v. 57, p. 1-7, 1991.
- AOAC (Association Official Analytical Chemists). Official methods of analysis. 16. ed. Arlington: AOAC International, 1995. Cap.41, p.3.
- AOAC (Association Official Analytical Chemists). Official methods of analysis. 16. ed. Arlington: AOAC International, 1995. Cap.43, p.3.
- APISARIYAKUL, A.; VANITTANAKOM, M.; BUDDHASUKH, D. Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 49, p. 163-169, 1995.
- BARBOSA, F.F.; BARBOSA, L.C.A.; MELO, E.C.; BOTELHO, F.M.; SANTOS, R.H.S. Influência da temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill). *Química Nova*, v. 15, n. 1, p. 1-5, 2006.
- BEUCHAT, L.R. Sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* to spices and organic acids. *Journal of Food Science*, v. 41, p. 899-902, 1976.
- BHAVANISHANKAR, T.N.; MURTHY, S.V. Effect of turmeric fractions on the growth of some intestinal and pathogenic bacteria *in vitro*. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 17, p. 1363-1366, 1979.
- BOONCHILD, C.; FLEGEL, T. *In vitro* antifungal activity of eugenol and vanillin against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 28, p. 1235-1241, 1982.

- BRANDÃO, G.C. Isolamento biomonitorado de substâncias antimicrobianas de *Polygonum spectabil* Mart e determinação da CIM para uma chalcona antimicrobiana. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2004.194p. (Dissertação, Mestrado em Ciências Farmacêuticas).
- CECÍLIO FILHO, A.B. Época e densidade de plantio sobre a fenologia e rendimento da cúrcuma (*Curcuma longa*). Lavras: UFLA. 1996.100p. (Tese, Doutorado em Fitotecnia).
- CECÍLIO FILHO, A.B.; SOUZA, R.J.; BRAZ, L.T.; TAVARES, M. Cúrcuma: planta medicinal, condimentar e de outros usos potenciais. *Ciência Rural*, v. 30, n. 1, p. 171-175, 2000.
- CEDILLO-RIVERA, R.; RAMÍREZ, A.; MUNOZ, O. A rapid colorimetric assay with the tetrazolium salt MTT and phenazine methosulfate (PMS) for viability of *Entamoeba histolytica*. *Archives of Medical Research*, v. 23, n. 2, p. 59-61, 1991.
- CHANDRA, D.; GUPTA, S.S. Anti-inflammatory and anti-arthritic activity of the volative oil of *Curcuma longa* (Haldi-Turmeric). *Indian Journal Medical Research*, v. 60, n. 138, 1972.
- CONNOR, D.E.; BEUCHAT, L.R. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *Journal of Food Science*, v. 49, p. 429-434, 1984.
- CORREA, M.P. Açafroeira. *Dicionário de plantas úteis do Brasil*. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, v. 1, p. 21-22, 1975.
- COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.
- DEANS, S.G.; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, v. 5, p. 165-180, 1987.
- DOCTOR FUNGUS. Disponível em: <<http://www.doctorfungus.org>>. Acesso em: 3 mar. 2006.
- DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antimicrobial activity of plant volative oils. *Journal of Applied Microbiology*, v. 88, p. 308-316, 2000.
- DUKE, J.A. *The green pharmacy*. Rodale, Emmaus, 1997, 507p.
- ESPINOSA, J.; ALIQUE, R.; LA PAZ, J.L. *Tecnología de la conservación de productos hortícolas*. Acribia. Madri: 1994. 432 p.
- FAO (Food and Agriculture Organization). *Food Nutrition Paper 52, Addendum 9*, 2001. Disponível em: <<http://www.apps3.fao.org/jecfa/additivespecs/docs/9/additive-0831.htm>>. Acesso em: 30 set. 2003.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Parte 1. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

- FERREIRA, S.R.S. Extração de óleo essencial de pimenta do reino com dióxido de carbono líquido supercrítico. Campinas: UNICAMP. 1991. 203 p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia de Alimentos).
- FREUND, R.P.; WASHAW, J.C.; MAGGION, M. Natural color for use in foods. *Cereal Foods World*, v. 33, n. 7, p. 553-556, 1988.
- GHANNOUM, M.A. Studies on the anticandidal mode of action of *Allium sativum* (garlic). *Journal of General Microbiology*, v. 134, p. 2917-2924, 1988.
- GOOLDWYN, L. Real spice of live. Disponível em: <<http://www.URL.http://lef.org/shop/dec-report97.html>>. Dezembro 1997. Acesso em: 24 fev. 1999.
- GOVINDARAJAN, V.S. Turmeric – chemistry, technology and quality. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 12, n.3, p. 199-301, 1980.
- GOYAL, R.K.; KORLA, B.N. Changes in the quality of turmeric rhizomes during storage. *Journal of Food Science and Technology*, v. 30, n. 5, p. 362-364, 1993.
- HALLAGAN, J.B.; ALLEN, D.C.; BORZELLECA, J.F. The safety and regulatory status of food, drug and cosmetics colour additives exempt from certification. *Food and Chemical Toxicology*, v. 33, n. 6, p. 515-528, 1995.
- HENDRY, G.A.F.; HOUGHTON, J.D. (Ed.) *Natural Food Colorants*. 2. ed. London: Blackie Academic & Professional, 1996. p. 69-74.
- HERTWING, I.F.V. *Plantas aromáticas e medicinais*. São Paulo: Ícone, 1986, p. 254-265.
- HESS, D. *Plant physiology*. New York: Springer-Verlag, 1975. p. 99-116.
- HOLLEY, R.A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, v. 22, p. 273-292, 2005.
- HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. Search for new antifungal compounds from higher plants. *Pure Applied Chemistry*, v. 66, n. 10/11, p. 2231-2234, 1994.
- IAL. *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. São Paulo: 1985. 553p.
- IEVEN, M.; VLIETINCK, A.J.; VANDEN BERGHE, D.A.; TOTTE, J. Plant antiviral agents. 3. Isolation of alkaloids from *Clivia miniata* Regal (Amaryllidaceae). *Journal of Natural Products*, v. 45, p. 564-573, 1982.
- JANSSEN, M.A.; SCHEFFER, J.J.C.; PARHAN-VAN ATTEN, A.W.; SVENDSEN, A.B. Screening of some essential oils for their activities on dermatophytes. *Pharmaceutische Weekblad (Scientific Edition)*, v. 10, p. 277-280, 1988.

- JASIM, F.; ALI, F. A novel and rapid method for the spectrofluorometric determination of curcumin in curcumin spices and flavors. *Microchemistry Journal Baghdad*, v. 46, p. 209-214, 1992.
- JAYAPRAKASHA, G.K.; RAO, L.J.M.; SAKARIAH, K.S. Chemistry and biological activities of *Curcuma longa*. *Trends in Food Science & Technology*, v. 16, n. 12, p. 533-548, 2005.
- JECFA (JOINT EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES). Summary of evaluations performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Disponível em: <http://www.jecfa.ilsa.org/search.cfm>>. Acesso em: 19 jul. 2006.
- JITOE, A.; MASUDA, T.; TENGAH, I.G.P.; SUPRAPTA, D.N.; GARA, I.W.; NAKATANI, N. Antioxidant activity of tropical ginger extracts and analysis of the contained curcuminoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.40, p. 1337-1340, 1992.
- KELKAR, N.C.; SANJEEVA RAO, B. Essential oil from the rhizomes of *Curcuma longa* L. *Indian Institute Science Journal*, v.17A, p. 7-24, 1934.
- KHALIQUE, A.; DAS, N.R. Examination of *Curcuma longa* L. part II. *Scientia Research*, v. 5, p. 44-49, 1968.
- KIM, D.S.H.L.; KIM, J.Y. Total synthesis of calebin-A, preparation of its analogues and their neuronal cell protectivity against β -amyloid insult. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 11, p. 2541-2543, 2001.
- KIM, M.; CHOI, G.; LEE, H. Fungicidal property of *Curcuma longa* L. rhizome-derived curcumin against phytopathogenic fungi in a greenhouse. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 7, n.1, p. 114-121, 2003.
- KNOBLOCH, K.; PAULI, A.; IBERL, N.; WEIGAND, N.; WEIS, H.M. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*, v. 1, p. 119-128, 1989.
- KRISHNAMURTHY, N.; MATHEW, A.G.; NAMBUDIRI, E.S.; SHIVASHANKAR, Y.S.; LEWIS, Y.C.; NATARAJAN, C.P. Oil and oleoresin of turmeric. *Tropical Science*, v. 18, n. 1, p. 37-45, 1976.
- LACHANCE, P.A.; GUHR, G. Role of phytochemicals in chronic disease prevention. In: LACHANCE, P.A. *Nutraceutical, designer foods III: garlic, soy and licorice*. Food & Nutrition Trumbull, 1997. p. 323-328.
- LEE, H.; CHOI, K.; CHO, K.; AHN, Y. Fungicidal activity of ar-turmerone identified in *Curcuma longa* rhizome against six phytopathogenic fungi. *Agricultural Chemistry and Biothechnology*, v. 46, n.1, p. 23-28, 2003.

- LEUNG, A.Y.; FOSTER, S. Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. 870 p.
- LIS-BALCHIN, M.; DEANS, S.G. Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. Journal of Applied Microbiology, v. 82, p. 759-762, 1997.
- LUTOMSKI, J.; KEDZIA, B.; DEBSKA, W. Effect of an alcohol extract and of active ingredients from *Curcuma longa* on bacteria and fungi. Planta Medica, v. 26, n. 1, p. 9-19, 1974.
- MAIA, N.B. A cúrcuma como corante. In: Seminário de Corantes Naturais. Campinas: SP, 1991. 65 p.
- MAIA, N.B.; BOVI, O.A.; DUARTE, F.R.; ALMEIDA, J.A.R. Influência de tipos de rizomas de multiplicação no crescimento de cúrcuma. Bragantia, v.54, n. 1, p. 33-37, 1995.
- MARTINS, M.C.; RUSIG, O. Cúrcuma – um corante natural. Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 26, n. 1, p. 53-65, 1992.
- MATA, A.R. Efeito do processamento e tempo de armazenamento sobre o perfil de voláteis da *Curcuma longa* L. empregando microextração por fase sólida e cromatografia gasosa. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 101p. 1999. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- MATA, A.R.; NELSON, D.L.; AFONSO, R.J.C.F.; GLÓRIA, M.B.A.; JUNQUEIRA, R.G. Identificação de compostos voláteis da cúrcuma empregando microextração por fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 24, n. 1, p. 151-157, 2004.
- MATHAI, C.K. Variability in turmeric curcuma spices germplasm for essential oil and curcumin. Qualitas Plantarum Foods Human Nutrition, v. 28, p. 219-225, 1976.
- McCARRON, R.M. Package that smells is not package that sells. Aroma permeability tested on flexible package materials. Candy Snack Industry, v. 137, n. 10, p. 54, 1972.
- MILÁN, D.R. Cúrcuma, produção e utilização como ingrediente e aditivo na indústria de alimentos. Revista Brasileira de Corantes Naturais, v. 1, n. 1, p. 248-249, 1992.
- MISRA, S.K.; SAHU, K.C. Screening some indigenous plants for antifungal activity against dermatophytes. Indian Journal of Pharmacology, v. 9, p. 269-273, 1977.
- NADKARNI, K.M.; NADKARNI, A.K. Ver. Ed. Indian Materia Medica, Popular Prakashan, Bombay, 1976.
- NCCLS (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, approved standard. 15 ed., v. 20, n. 2, 33 p., 2000.

- NCCLS (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS). Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade a terapia antifúngica dos fungos filamentosos, norma aprovada. v. 22, n. 16, 50 p., 2002.
- NCCLS (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS). Performance standards for antimicrobials disk susceptibility test, approved standard, M-2A5, 1993.
- OGA, S. Fundamentos de toxicologia; uso racional de medicamentos. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 407-439.
- OGUNTMEIN, B.O.; WEYERSTAHL, P.; MARSCHALL-WEYERSTAHL, H. Essential oil of *Curcuma longa* L. leaves. Flavour and Fragrance Journal, v. 5, p. 89-90, 1990.
- OLIVEIRA, V.P.; GHIRALDINI, J.E.; SACRAMENTO, C.K. O cultivo de plantas produtoras de corantes. Revista Brasileira de Corantes Naturais, v. 1, n. 1, p. 232-237, 1992.
- OSAWA, T.; SUGIYAMA, Y.; INAYOSHI, M.; KAWAKISHI, S. Antioxidative activity of tetrahydrocurcuminoids. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, v. 59, n.9, p. 1609-1612, 1995.
- OUATTARA, B.; SIMARD, R.E.; HOLLEY, R.A.; PIERRE, G.J.; BÉGIN, A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. International Journal of Food Microbiology, v. 37, p. 155-162, 1997.
- PATOLOGIA DAS SEMENTES. Disponível em: <<http://www.patologiadasementes.com.br>> Acesso em: 3 mar. 2006.
- PÉRET-ALMEIDA, L. Influência da radiação gama na inibição do brotamento do rizoma e na qualidade da cúrcuma em pó. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2000. 60p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- PÉRET-ALMEIDA, L. *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. 2006.136p. (Tese, Doutorado em Ciência de Alimentos).
- PÉRET-ALMEIDA, L.; CHERUBINO, A.P.F.; ALVES, R.J.; DUFOSSÉ, L.; GLÓRIA, M.B.A. Separation and determination of the physico-chemical characteristics of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. Food Research International, v. 38, p. 1039-1044, 2005.

- PÉRET-ALMEIDA, L.; NAGHETINI, C.C.; NUNAN, E.A.; GLÓRIA, M.B.A. Atividade antimicrobiana de diferentes extratos de *Curcuma longa* L. 2º Simpósio em Ciência de Alimentos. SIMPOCAL/SBCTA. Florianópolis, SC, 28 a 30 de maio de 2003 (Pôster).
- PEROTTI, A.G. Curcumin – a little known but useful vegetable colour. *Industria Alimentaria*, v. 14, n. 6, p. 66-68, 1975.
- PIMENTEL-GOMES, F. Curso de estatística experimental. 13. ed. Piracicaba: Nobel, 1990. 468 p.
- RAMIREZ-TORTOSA, M.C.; AGUILERA, C.M.; CARRIÓN-GUTIÉRREZ, M.A.; RAMIREZ-BOSCÁ, A.; GIL, A. Curcumin ethanol-aqueous extract inhibits *in vitro* human low density lipoprotein lipoperoxidation. In: SADLER, M.J.S. Functional foods, the consumer, the products and the evidence. The Royal Society of Chemistry. London: 1998. p. 111-115.
- RICCI, D.; FRATERNALE, D.; GIAMPERI, L.; BUCCHINI, A.; EPIFANO, F.; BURINI, G.; CURINI, M. Chemical composition antimicrobial and antioxidant activity of the essential oils of *Teucrium marum* (Lamiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 98, p. 195-200, 2005.
- RICHARD, H.; LOO, A. Composition des extraits d' épices et herbes aromatiques. In: RICHARD, H. (Coord). Épices & aromates. Paris: TEC & DOC – Lavoisier, 1992. p. 213-238.
- RICHMOND, R.; POMBO-VILLAR, E. Gas chromatography-mass spectrometry coupled with pseudo-sadtler retention indices, for the identification as components in the essential oil of *Curcuma longa* L. *Journal of Chromatography A*, v. 760, p. 303-308, 1997.
- RIOS, J.L.; RECIO, M.C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 23, p. 127-149, 1988.
- ROMERIO, E.; TATEO, F.; DEBIAGGI, M. Antiviral activity of *Rosmarinus officinalis* L. extract. *Mitteilungen Aus Dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung and Hygiene*, v. 80, p. 113-119, 1989.
- ROTH, G.N.; CHANDRA, A.; NAIR, M.G. Novel bioactivities of *Curcuma longa* constituents. *Journal Natural Products*, v. 61, p. 542-545, 1998.
- RUPE, H.; CLAR, G.; PFAU, A.; PLATTNER, P.C. Volative plant constituents II. Turmerone, the aromatic principle of turmeric oil. *Helvetica Chimica Acta*, v. 17, p. 372-389, 1934.

- RUPE, H.; GASSMANN, A. Ar-turmerone from curcuma oil. *Helvetica Chimica Acta*, v. 19, p. 569-571, 1936.
- SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, anti radicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, v. 91, p. 621-632, 2005.
- SAMPATHU, S.R.; KRISHNAMURTHY, N.; SOWBAGYA, H.B.; SHANKARANARAYANA, M.L. Studies on quality of turmeric (*Curcuma longa* L.) in relation to curing methods. *Journal in Food Science and Technology*, v. 25, n. 3, p. 152-155, 1988.
- SAN LIN, R.I. Phytochemicals and antioxidants. In: GOLDBERG, I. *Functional foods, designer foods, pharmafoods, nutraceuticals*. Chapman & Hall. New York: 1994. p. 409.
- SCARTEZZINI, P.; SPERONI, E. Review on some plants of indian traditional medicine with antioxidant. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 17, p. 23-43, 2000.
- SHADOMY, S., ESPINELL-INGROFF, F. Methods for bioassay of antifungal agents in biologic fluids. In: O' LEARY W. (Ed) *Practical Handbook of Microbiology*. CRC Press, 2000. p. 631-641.
- SHARMA, R.K.; MISRA, B.P.; SARMA, T.C.; BORDOLOI, A.K.; PATHAK, M.G.; LECLERCQ, P.A. Essential oils of *Curcuma longa* L. from Bhutan. *Journal Essential Oil Research*, v. 9, p. 589-892, 1997.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmagnosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre: 2. ed. UFRGS, 2000. 821p.
- SINGH, G.; SINGH, O.P.; MAURYA, S. Chemical and biocidal investigations on essential oils of some Indian curcuma species. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, v. 45, p. 75-81, 2002a.
- SINGH, R.; CHANDRA, R.; BOSE, M.; LUTHRA, P.M. Antibacterial activity of *Curcuma longa* rhizome extract on pathogenic bacteria. *Current Science*, v. 83, n. 6, p. 737-740, 2002b.
- SKOCIBUSIC, M.; BEZIC, N.; DUNKIC, V. Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis. growing in Croatia. *Food Chemistry*, v.96, p. 20-28, 2006.
- SOUZA, C.R.A. *Cúrcuma: caracterização extração e estabilidade*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 1993.79p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).

- SOUZA, C.R.A.; GLÓRIA, M.B.A. Chemical analysis of turmeric from Minas Gerais, Brazil and comparison of methods for flavor free oleoresin. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 41 n. 2, p. 218-224, 1998.
- SRIMAL, R.C.; DHAWAN, B.N. Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-steroidal anti-inflammatory agent. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 25, p. 447-452, 1973.
- SUI, Z.; SALTO, R.; LI, J.; CRAIK, C.; MONTELLANO, P.R.O. Inhibition of the HIV-1 and HIV-2 proteases by curcumin and curcumin boron complexes. *Biorganic and Medicinal Chemistry*, v.1, n. 6, p. 415-422, 1993.
- TAINTER, D.R.; GRENIS, A.T. *Especies y aromatizantes alimentarios*. Zaragoza: Ed Acribia, 1996. 251 p.
- TAKAHASHI, M.Y. *Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões e identidade*. 2. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1987. 118p.
- TALLON-NETTO, B.D. *Influência do processamento na qualidade da cúrcuma em pó e dos pigmentos curcuminóides purificados*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2004. 79p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- THARIB, S.M.; GNAN, S.O.; VEITCH, G.B.A. Antimicrobial activity of compounds from *Artemisia campestris*. *Journal of Food Protection*, v. 46, p. 185-187, 1983.
- TUBEROSO, C.L.G.; KOWALCZYK, A.; CORONEO, V.; RUSSO, M.T.; DESSI, S.; CABRAS, P. Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and antifungal activities of the essential oil of *Achillea ligustica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 10148-10153, 2005.
- VANDEN BERGHE, D.A.; VLIETINCK, A.J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: HOSTETTMANN, K. (Ed.) *Methods in plant biochemistry, assays for bioactivity*. Londres: Academic Press, 1991. p. 47-69.
- VASCONCELOS, A.F.F.; GODINHO, O.E.S. Uso de métodos convencionados no estudo da autenticidade do óleo de copaíba. *Química Nova*, v. 25 (6B), p. 1057-1060, 2002.
- VELLUTI, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J.; TURON, C.; MARÍN, S. Impact of essential oils on growth rate, zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* under different temperature and water activity conditions in maize grain. *Journal of Applied Microbiology*, v. 96, p. 716-724, 2004.
- VIASAN, A.C.; MENON, A.N.; RAD, M.J.; NARAYANAN, C.S.; MATHEW, A.G. Chemical analysis of some cultivars of *Curcuma longa* Linn. *Journal of Food Science and Technology*, v. 26, n. 5, p. 293-295, 1989.

- WONG, D.W.S. Química de los alimentos; mecanismo y teoría. Zaragoza: Acribia, 1995. p. 259-294.
- YU, Z.F.; KONG, L.D.; CHEN, Y. Antidepressant activity of aqueous extract of *Curcuma longa* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 83, p. 161-165, 2002.
- ZAIKA, L.L.; KISSINGER, J.C.; WASSERMAN, A.E. Inhibition of lactic acid bacteria by herbs. *Journal of Food Science*, v. 48, p. 1455-1439, 1983.
- ZWAVING, J.H.; BOS, R. Analysis of the essential oils of five *Curcuma* species. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 7, p. 19-22, 1992.